

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-238683

(43) 公開日 平成9年(1997)9月16日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/02		9282-4B	C 1 2 N 15/00	C
A 0 1 K 67/027			A 0 1 K 67/027	
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
C 0 7 K 14/47			C 0 7 K 14/47	
16/18			16/18	

審査請求 未請求 請求項の数15 O L (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平8-55144	(71) 出願人	596013888 株式会社エイジーン研究所 神奈川県鎌倉市梶原200番地
(22) 出願日	平成8年(1996)3月12日	(72) 発明者	古市 泰宏 神奈川県鎌倉市梶原200番地 株式会社エ イジーン研究所内
		(72) 発明者	後藤 眞 東京都練馬区関町南4丁目11番12号
		(74) 代理人	弁理士 平木 祐輔 (外1名)

(54) 【発明の名称】 ウェルナー症候群の原因遺伝子の存在する領域にある新規WS-3遺伝子及びその遺伝子がコードするタンパク質

(57) 【要約】

【解決手段】 配列番号2で表されるアミノ酸配列を実質的に含むポリペプチドをコードし、WS領域に存在するヒトWS-3遺伝子、該遺伝子の少なくとも一部とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブ、該遺伝子を含む組換え体DNA、該組換え体DNAによって形質転換された形質転換体、配列番号2で表されるアミノ酸配列を実質的に含むポリペプチド、該ポリペプチドの製造方法、該ポリペプチドと特異的に反応するモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、該遺伝子を用いて作られるトランスジェニック・ノックアウトマウス、及び前記遺伝子の用途。

【効果】 本発明により、ウェルナー症の治療・診断に有用な遺伝子、ポリペプチド、抗体が提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を実質的に含むポリペプチドをコードする WS-3 遺伝子。

【請求項 2】 上記遺伝子が、配列番号 1 又は 3 で表される塩基配列のいずれかのものである請求項 1 記載の WS-3 遺伝子。

【請求項 3】 請求項 1 又は 2 記載の遺伝子の少なくとも一部とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項 4】 請求項 1 又は 2 記載の WS-3 遺伝子を含む組換え体 DNA。

【請求項 5】 請求項 4 記載の組換え体 DNA によって形質転換された形質転換体。

【請求項 6】 請求項 5 記載の形質転換体を培養し、得られる培養物から WS-3 遺伝子がコードするポリペプチドを採取することを特徴とする前記ポリペプチドの製造方法。

【請求項 7】 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を実質的に含む、WS-3 遺伝子がコードするポリペプチド。

【請求項 8】 請求項 7 記載のポリペプチドと特異的に反応するモノクローナル抗体。

【請求項 9】 請求項 7 記載のポリペプチドと特異的に反応するポリクローナル抗体。

【請求項 10】 請求項 7 記載のポリペプチドで免疫された抗体産生細胞とミエロマ細胞とを融合させることにより得られる、請求項 8 記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドマ。

【請求項 11】 請求項 3 記載のオリゴヌクレオチドプローブを含む遺伝子の検出用試薬。

【請求項 12】 請求項 7 記載のポリペプチド、並びに請求項 8 記載のモノクローナル抗体及び／又は請求項 9 記載のポリクローナル抗体を含む診断用キット。

【請求項 13】 請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の遺伝子の機能を失った遺伝子が導入されたノックアウトマウス。

【請求項 14】 請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の遺伝子の発現レベルを上昇又は下降するように修飾された遺伝子が導入されたマウス。

【請求項 15】 請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の遺伝子が導入されたトランスジェニックマウス。

【発明の詳細な説明】

【0001】 近年、ポジショナルクローニングの手法により、長大な染色体上の特定遺伝子を明らかにすることが出来るようになってきている。我々は、このポジショナルクローニング方法を駆使し、ウェルナー症候群の原因となる遺伝子領域（以下、ウェルナー領域又は WS 領域と記す）のコンティグマップ（以下、遺伝子物理地図と記す）を作成し、最終的にこの WS 領域内に新規 WS-3 遺伝子を見出し本発明を完成するに至った。

【0002】 すなわち、本発明は、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を実質的に含むポリペプチドをコードする WS-3 遺伝子である。該遺伝子としては、配列番号 1 又は 3 で表される塩基配列のいずれかのものが挙げられる。ここで、「実質的に含む」とは、当該ポリペプチドによってコードされる遺伝子が WS-3 としての機能を有する限り、そのポリペプチドに含まれるアミノ酸配列に欠失、置換、挿入等の変異が生じてよいことを意味する。また、「WS-3 遺伝子」とは、ウェルナー領域に含まれる新規遺伝子を意味する。

【0003】 さらに、本発明は、前記 WS-3 遺伝子の少なくとも一部とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブである。さらに、本発明は、前記 WS-3 遺伝子を含む組換え体 DNA である。さらに、本発明は、前記組換え体 DNA によって形質転換された形質転換体である。さらに、本発明は、前記形質転換体を培養し、得られる培養物から WS-3 遺伝子がコードするポリペプチドを採取することを特徴とする前記ポリペプチドの製造方法である。

【0004】 さらに、本発明は、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を実質的に含む、WS-3 遺伝子がコードするポリペプチドである。さらに、本発明は、前記ポリペプチドと特異的に反応するモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体である。さらに、本発明は、前記ポリペプチドで免疫された抗体産生細胞とミエロマ細胞とを融合させることにより得られる、前記モノクローナル抗体を産生するハイブリドマである。さらに、本発明は、前記オリゴヌクレオチドプローブを含む遺伝子の検出用試薬である。

【0005】 さらに、本発明は、前記ポリペプチド、並びに前記モノクローナル抗体及び／又はポリクローナル抗体を含む診断用キットである。さらに、本発明は、前記 WS-3 遺伝子の機能を失った遺伝子が導入されたノックアウトマウスである。さらに、本発明は、前記 WS-3 遺伝子の発現レベルを上昇又は下降するように修飾された遺伝子が導入されたマウスである。さらに、本発明は、前記 WS-3 遺伝子が導入されたトランスジェニックマウスである。

【0006】 以下、本発明を詳細に説明する。まず、WS 遺伝子（ウェルナー症候群の原因となる遺伝子）の存在位置を探索するにあたり、WS 領域のうち、最もその存在が高いと推察される領域に関して P1 及び PAC ファージ DNA を用いた遺伝子物理地図を作成する（図 1）。

【0007】 遺伝子物理地図は、P1 及び PAC ファージ等のベクター中に組み込まれた平均鎖長 90Kbp の長さを持つヒト DNA 断片を正確につなぎ合わせることににより作成することができ [下記の (1)～(4)]、以後のクローニング実験を容易にすることができる。即ち、(1) 目的のマーカー DNA と同一の塩基配列を含む DNA 断片 (P1/PAC クローン) をライブラリー中から選択する。(2) 次に、

得られたクローンについて、塩化セシウム（以下、CsClと略す）を用いた超遠心分離により精製後、組み込まれているDNA断片の両末端の塩基配列を決定する。(3)さらに、この塩基配列の情報をもとにして、ポリメラーゼ連鎖反応法（米国特許4683195号、1987年7月28日；以下、PCRと略す）用のプライマーを少なくとも1対（即ち2本）作製し、PCR反応を行う。(4)(3)の操作により得られたPCR産物をプローブとして用いて、目的とする塩基配列と同一の塩基配列を含むDNA断片（P1/PACクローン）をライブラリー中から選択する。(5)(1)～(4)の操作を繰り返し、順次DNA断片をつなげる正確な操作を行い、数百万塩基対にも及ぶ長大な領域をクローン化した数多くのP1/PAC DNAの連鎖からなる遺伝子物理地図を構築する（図1）。物理地図の確認は、リンパ球細胞を用いたFluorescence in situ hybridization（以下、FISHと記す）により行う。FISHは、P1/PAC DNAが正しい順序でつながられているか、また、複数のスタート地点から出発したP1/PAC DNAの、いまだつながっていないギャップの距離はどの程度であるかを知るための手法の1つである。

【0008】このようにして得られた遺伝子物理地図、及びこれを構成するクローン化P1/PAC DNAを用いて、cDNAの検出及び塩基配列の決定を行う。cDNAの検出は、エキソントラッピング法により得られるcDNAの一部のエキソンの塩基配列を決定し、PCR、ノーザンブロット解析をすることにより行うことができる。また、塩基配列の決定は、PCRをベースとした方法により行うことができる。例えば、上記エキソントラッピング法により得られるエキソンの断片を鋳型とし、配列番号4、5、20又は21で表される配列をプライマーとして、PCRを行う。

【0009】本発明により明らかになったWS-3遺伝子はヒト由来のものであり、配列番号2で表されるアミノ酸配列を実質的に含む（図2）。本発明により、WS-3遺伝子は、ヒトゲノム上のWS領域内にあるものの、WS-3遺伝子の転写方向は不明である。また、図3に示すFISHの結果から明白なように、当該WS-3遺伝子は、ヒト染色体第8番の8p11.2-p12.1付近に存在することが確認され、さらに、本発明者らは、【実施例5】に詳述したサザンブロット解析により、WS-3遺伝子はヒトゲノム上でファミリーを形成して存在している可能性を明らかにした（図4A及び図4B）。なお、ヒトWS-3遺伝子に相当する他種の遺伝子は、Zoo Blotによる解析結果より、ヒトWS-3遺伝子の塩基配列とホモロジーを有していたことから（図4C及び図4D）、公知技術によりクローニングすることが可能である。

【0010】以上の発明を完成するに至った基本的要因は、WS-3遺伝子が遺伝子物理地図上「ウェルナー原因遺伝子と最も強い連鎖を示すSTSマーカー、D8S1055、D8S339、GSRを含む領域」にあることを見出した（図1）ことである。図1において、100kbp単位でスケール表示

された直線（尺度線）の直下に影付ボックスで示したものは、そこから転写される代表的な遺伝子の名称とその大体の転写位置である。これらの遺伝子は、テロメア側からセントロメア側に向かってWS-3遺伝子（本発明による新規遺伝子）、チューブリン偽遺伝子（Tu-φ）、WS遺伝子、TFIIEβ（Transcription factor, TFIIEβサブユニット）遺伝子、GSR（Glutathione S-reductase）遺伝子、WS-2遺伝子及びPP2Aβ（Protein phosphatase 2Aβサブユニット）遺伝子である。多数の下向きの矢印（↓）が示す影付きのバーは、ヒトゲノムDNAを概略図として示したものである。尺度線と該概略図との間に記載された記号（例えばD8S1055、D8S339等）は、これまでに知られているSTS（Sequence Tagged Sequence）マーカーであり、それらのおおよその位置を示している。ヒトゲノムDNAの概略図の下に記載された多数の短い実線は、遺伝子物理地図を構築しているP1あるいはPAC由来のDNAであり、本発明者らの便宜のための番号（例えばPAC由来の#6207）が付してある。

【0011】括弧内の数字は、それぞれのDNAのおおよその大きさ（例えば、#2587では65Kb）を示している。これらのDNAの末端にあるオープンスクエア（□）及びオープンダイヤモンド（◇）の記号は、DNAの方向を決めるためにDNA末端に連結されたプロモーターの存在を示すものであり、それぞれ、P1/PACファージベクター中に設置してあったSP6プロモーター及びT7プロモーターを意味する。また、「●」は各P1/PACクローンにSTSが、「○」は各P1/PACクローンにT7、SP6末端の塩基配列が含まれていることが確認済であることを意味する。

【0012】WS-3遺伝子がWSの原因遺伝子そのものであるか否かは、ウェルナー症患者及び健常人の線維芽細胞から得られた全RNAを用いて、WS-3 cDNAクローンをプローブとして行うノーザンブロット解析により判断することができる。ノーザンブロット解析の結果、両者に於いてmRNAのサイズ・発現量に差が認められなかったが

（図5及び表11）、個体レベルにおいて、この遺伝子がウェルナー症候群の原因となっているかどうかを調べるが必要であり、今後の研究が待たれる。

【0013】以上に述べた結果は、WS領域内に存在する他の遺伝子由来のmRNA、例えばプロテインフォスファターゼmRNA（PP2Aβ）、グルタチオン-S-レダクターゼ（GSR）mRNA、Transcription factor TFIIEβ（TFIIEβ）mRNAを検出する各種プローブを用いたノーザンブロット解析でも同様であり、いずれのmRNAの鎖長・発現量に関してもウェルナー症患者と健常人の両者に於いて相異はなかった。

【0014】ヒトWS-3遺伝子が各種臓器に於てどのように発現しているかを調べる多組織ノーザンブロット（multi-Tissue Northern Blot）解析については【実施例6】に示されている（図5A）。この結果から、WS-3遺伝子は、心臓、骨格筋及び脾臓に於て強く発現し、脳、胎

盤、肺、肝臓、腎臓、脾臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、小腸、大腸において中程度に発現し、末梢リンパ球に於ては、僅かしか発現していないことがわかった。

【0015】以上の結果を総合すると、WS-3遺伝子は、種を越えて比較的良く保存され（図4C及び図4D）、かつ、ヒトのさまざまな組織において高い発現が認められたことから（図5A）、生体の基本的な恒常性の維持に関わる未知の構成成分をコードしている遺伝子の一つであることが強く示唆され、この遺伝子の発現制御を解明することは、生体の恒常性維持を司るメカニズムを解明するうえで有用であり、また、生命の基本的な恒常性を維持するための新規医薬品の創製にも有用であると共に、ウェルナー症候群発症との関連を解明するための研究にも有用である本発明のWS-3遺伝子は、例えば以下のようにして同定し取得することができる。I. ゲノムDNA及びRNAの調製

(1) 細胞サンプルの収集とゲノム DNA調製

ヒト血液リンパ球からのゲノム DNA調製は、Molecular Cloning (Sanbrook, Fritschand Maniatis, Cold Spring Harbor 出版) に記載された方法により行うことができる。まず、新鮮な血液を、Sucrose、Tris-HCl緩衝液 (pH 7.5)、MgCl₂ 及び1% Triton X-100 を含む溶液と混合して溶血し、氷上に静置後遠心し、リンパ球を含むペレット画分を得る。このペレットをNaCl及びEDTAを含む溶液に懸濁し、プロテイナーゼ K、5% SDS及びTris-HCl緩衝液 (pH 8.0) を加え、37℃で一晩インキュベートする。この後、5mlからなる1容のフェノールと1容のクロロホルム-イソアミルアルコール (24:1) の混液とを加え、静かに回しながらゲノムDNAの抽出を行う。遠心後上清画分を分取し、フェノール/クロロホルムによる抽出を繰り返す。遠心分離により得られる上清に、20%容の3M 酢酸ナトリウム液 (pH 5.2) を加え、更に2.5倍容のエタノールを加え、ゲノムDNAを析出させる。綿状のDNAをガラスパスツールピペットで巻取り、10mM Tris-HCl (pH 8.0) 及び0.2mM EDTAを含む1.25mlのバッファーに溶かす。

【0016】ヒト胎盤組織からのゲノムDNAの精製は、健常人妊婦より得た新鮮な胎盤をドライアイス上で凍結させ、スライサーを用いて極く薄い切片にするか、又は細粉したものを材料として用いて行う。細かくした凍結胎盤破片から、Gross-Bellardらの方法 [Eur. J. Biochem. 36, 32-38 (1973)] に従ってゲノムDNAを抽出・精製する。

【0017】(2) 細胞株の確立及び全RNAの調製

臨床診断的に認定されたウェルナー症患者（以下、WS患者と記す）からパイオプシーにより得られる皮膚組織切片をもとにWS繊維芽細胞株を確立し、全RNA及びpoly A+ 含有mRNA（以下 poly A+ mRNA と記す）を精製する。同様にして、健常人皮膚組織切片からの健常人繊維芽細胞株の確立と共にRNAを精製する。

【0018】mRNAの調製は、以下の方法で行う。WS患者又は健常人由来の培養ヒト繊維芽細胞をトリプシンによりペトリ皿からはがし、PBS で十分に洗浄後、6M グアニジウムチオシアネート溶液中でホモジナイズし、Chirgwinらの方法 [Biochemistry 18, 5294-5299 (1979)] に従い、塩化セシウム平衡密度勾配遠心法により全RNAを沈殿として分離する。分離後、フェノール抽出、エタノール沈殿等により全RNAを精製する。poly A+ mRNA 群を得る場合には、全RNAにオリゴ(dT)を共有結合で表層にもつラテックス粒子、オリゴデックス (dT)-30 (宝酒造社製) を加え、Kuribayashi-Ohtaらの方法 [Biochem. Biophys. Acta. 1156, 204-112 (1993)] に従い、パッチ法によるアフィニティクロマトグラフィーにより精製する。

【0019】これらの繊維芽細胞からのmRNAは、逆転写酵素を用いてcDNAを調製するための試料として用いるのみならず、WS患者のある特定のmRNAが質的（サイズ及びファミリーの存在）及び量的（発現量及びコピー数）に健常人と比較して変動しているか否かをノーザンブロット解析する際の試料としても用いることができる。

II. 遺伝子物理地図の構築

(1) P1/PACファージライブラリーの構築

P1/PACファージライブラリーの作製及びP1/PACクローンの遺伝子物理地図作製のため、ヒトDNA断片を含むP1/PACファージDNAを、特異的な配列を持つ DNAプライマーを用いたPCR法によりP1/PACファージライブラリーから選別する。なお、P1/PACとは、巨大な遺伝子領域を迅速にかつ精度高く解析するため、λファージ系 (10~20kb) よりも大きく、YAC (1~2 Mb) とコスミド (20 ~40kb) の中間サイズのDNA (80~150kb) をクローン化できる系として開発されたファージ・クローニングベクターをいう。

【0020】P1/PACファージライブラリーには、Smolleeら [Chromosoma 100, 487-494 (1991)] 又は田代ら（実験医学別冊「ゲノムのマッピングとシーケンス解析法」、バイオマニュアルシリーズ6、1994年、羊土社）によって作製法が記載されているGenome System 社製 (8620 Pennell Dr. St. Louis, Missouri, USA) のものを用いることができる。

【0021】本発明者らがWS領域を迅速かつ高精度に解析するクローニングシステムとしてP1/PACファージを選出したのは、(a) 大腸菌を宿主とするためクローン化DNAの回収が容易であり、また組み込まれたDNAが安定であるという利点、(b) Sp6 及びT7プロモーター配列が配置されている（コンティグ作製やウォーキングの際、インサートDNAの両末端の塩基配列を読む必要が生じるのであるが、Sp6及びT7プロモーターは、これを可能とする）という利点、(c) 宿主である大腸菌に感染したファージDNAは、以降通常のプラスミドとして取り扱える上に、通常のコロニーハイブリダイゼーション法が利用で

きるという優れた特徴を持っていることによる。

【0022】(2) P1/PACファージクローンのスクリーニング

P1/PACファージクローンのスクリーニングは、Smollerら [Chromosoma 100, 487-494 (1991)] に記載された方法により行う。すなわち、ナイロン膜上、P1/PACファージが感染した大腸菌を広げ、培養を行い、1 mM イソプロピル-1-チオ- β -D-ガラクトプラノシド (以下、IPTGと記す) 及び25 mg/mlのカナマイシンを含むLBプレート上で37℃で6時間培養し、P1/PACファージの大腸菌あたりのコピー数を増幅させる。この後、フィルター上の大腸菌を常法に従い溶菌させると共に、ファージDNAを含む2本鎖DNAをアルカリ変性させて1本鎖DNAとし、このDNAをUV照射又は加熱によりナイロン膜上に固定させる。目的とするP1/PACファージクローンを得るために、放射性リン酸 [32 P] で標識したDNAプローブをランダムヘキサマー反応 [Feinberg and Vogelstein, Addendum. Anal. Biochem. 137, 266-267 (1984)] やPCR法により調製し、これを用いたハイブリダイゼーションにより目的とするP1/PACクローンを選別・単離する。

【0023】(3) P1/PAC DNAの調製

P1/PACファージクローンからのDNAの回収と精製は、Smollerら [Chromosoma 100, 487-494 (1991)] によって記載された方法に少し変法を加えて行った。詳細は〔実施例1〕に記す。

【0024】(4) P1/PAC DNA末端部位の塩基配列の決定
P1/PAC DNAをオーバーラップさせつつ整列させ、遺伝子物理地図を完成させるため、各P1/PAC DNAクローン中に挿入されているインサートDNAの両末端部位の塩基配列を決定する。塩基配列の決定は、Hattori ら [Electrophoresis 13, 560-565 (1992)] により記載されたPCRをベースにした方法により行う。すなわち、P1/PACベクターに存在するSP6及びT7プロモーターに結合する二種のプライマー [SP6側プライマー (配列番号5) とT7側プライマー (配列番号6)] を用い、蛍光ダイデオキシターミネーターを含有するPRISM Sequenceing Kit (Perkin Elmer 社製) を使って反応を行い、Applied Biosystem社製のオートシーケンサー (model ABI 373) を用いてPCR 反応後の遺伝子断片の塩基配列を読み取り、附属のMacintosh コンピューターによりデータの解析を行う。

【0025】(5) Dual-color FISH 分析による各P1/PAC DNAクローンのWS領域への帰属

FISHとは、細胞核に蛍光標識をしたDNAプローブをハイブリダイズさせ、細胞核上でそのDNAの位置を目に見える形で検出する方法である。標本としては、分裂間期又は染色体がはっきり見える分裂中期の細胞が用いられる。

【0026】分裂中期の細胞は次の手順で得ることができる。末梢血細胞をフィトヘムアグルチニン (PHA) で刺

激して細胞分裂を促進し、コルセミドを用いて分裂中期で分裂を停止させる。細胞は酢酸/メタノール溶液で固定した後に、スライドガラスの上に広げる。スライドガラス上の標本はホルムアミドと SSC [Standard Saline Citrate; 0.15M NaCl, 0.015M Sodium Citrate (pH 7.0)] により変性させる。次に、ジゴキシゲニン又はビオチンで標識したDNAプローブを反応させると、この標識DNAは標本とハイブリダイズする。次に、ロダミン標識した抗ジゴキシゲニン抗体又は FITC-標識アビジンなどで処理して蛍光標識すると、DNAプローブがハイブリダイズした位置をロダミンについては赤色、FITCについては緑色のシグナルとして見るができる。

【0027】ビオチンを標識したWS-3遺伝子を含むPACクローンDNA (#6207)のプローブを、細胞分裂中期のヒト末梢血リンパ球細胞の標本にハイブリダイズした。その後、蛍光色素 (FITC) 標識したアビジンでこの標本を染色した。図3中の番号1に示すように、FITCのシグナルは、第8染色体のセントロメアを特異的に染める標準DNAプローブ (ロダミン標識; 番号2で示す) の近傍の短腕部分に存在する。従って、WS-3遺伝子を含むPACクローンDNAは、第8染色体短腕部分に存在することが分かった。

【0028】III. エキソントラッピング法によるcDNAエキソンの調製

(1) エキソントラッピング法

WS遺伝子領域をカバーする遺伝子物理地図を作成した後、この遺伝子物理地図を構成するP1/PAC DNAからエキソントラッピング法により直接エキソン部分が単離される。詳細については〔実施例2〕に記す。決定された塩基配列については、既存の遺伝子に該当するものの有無、又は既存の遺伝子と相同配列を持つものの有無をデータベースで検索する。

【0029】(2) エキソンジョイニング

エキソントラッピング法によって得られたエキソンの断片の長さは、数十bp〜400bpの範囲であり、平均200bp前後である。この大きさでは、cDNAのクローニング、サザンブロット、ノーザンブロット法など種々の解析をするには短いため、エキソン同士をPCRを用いて連結する工夫を行う。

【0030】エキソンの連結については、エキソントラッピング法によって得られた各エキソンのプライマーを選んで、RT-PCRによって作製したcDNAをテンプレートとして、一組のFP (センス配列: フォワードプライマー) とRP (ノンセンス配列: リバースプライマー) を用いてPCRを行う。すなわち、それぞれのエキソン部分の配列に対してセンス鎖及びアンチセンス (ノンセンス) 鎖の配列からなる20塩基程度のプライマーを作製し、連結の対象となる2種類のエキソンの一方をセンス鎖プライマー、他方をアンチセンス鎖プライマーとして任意に選択し、PCRを行うことにより連結することができる。

【0031】例えば、2種類のエクソンの一方をエクソンA、他方をエクソンBとし、エクソンAとエクソンBとが本来ABの順で整列しているとすると、エクソンAに対応するPCR産物（センスプライマーを用いて合成されたDNA断片であるとする）の3'末端に、エクソンBに対応するPCR産物（アンチセンスプライマーを用いて合成されたDNA断片であるとする）の5'末端が連結し、本来のABの順に整列するエクソンが得られる。このようにして、二つ以上のエクソンにまたがるPCR産物を得ることができる。

【0032】(3) 塩基配列の決定

塩基配列の決定は、Hattoriら [Electrophoresis 13, 560-565 (1992)] により記載されたPCRをベースにした方法により行うことができる。Perkin Elmer社製の蛍光ダイデオキシターミネーターを含有するPRISM Sequencing Kitを使って反応を行い、Applied Biosystems社製のオートシーケンサー（モデル ABI 373）で塩基配列を読み取り、附属のMacintoshコンピュータによりデータの解析を行う。詳細については〔実施例3〕に記す。

【0033】IV. TAIL-PCR法によるエクソンの伸長
WS領域の遺伝子物理地図を構成するP1/PAC DNAから、エクソントラッピング法により直接エクソン部分を単離する事が可能であるが、この方法によって得られた各エクソン断片の長さは、数十bpから400bpの範囲で、平均200bp前後である。通常、この大きさでは、cDNAのクローニング、サザンブロッティングなど種々の解析には小さすぎるため、より長いcDNA断片を得ることが必要となる。そこで、より長いcDNA断片を得るため、各エクソンのプライマー同士の組み合わせでPCRを行う前記エクソジョイニング法(III-(2)参照)やTAIL-PCR法を試みる。TAIL-PCR法は、従来のRACE法と比較し簡便で、種々のcDNAクローンを5'側あるいは3'側に、より長く、正確に伸長させることができる方法である。その詳細については〔実施例3〕に記す。

【0034】V. Marathon™ cDNA Amplification Kitを用いたWS-3 cDNAのクローニング

このキットは、Long-distance (LD) PCR法と Suppression PCR法の2つの原理に基づいてRACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) を行い、既知の部分配列から、未知の5'、3'両端を含む配列を増幅し、さらに、それらの融合によって完全長のcDNAを得ることを可能にする。

【0035】まず、アダプターを連結したした鋳型二本鎖cDNAとアダプタープライマー (AP)、遺伝子特異的プライマー (GSP)を利用してLD PCRを行い、5'及び3'端をそれぞれ含む断片を増幅する。その際、AP-1は、アダプターの突出末端と同じ配列を持つため、アダプターにはアニーリングせず、一回目の増幅では、GSPからのみ伸長する(Suppression PCR)。次に、5'及び3'端

をそれぞれ含む2種類の断片(5'-及び3'-RACE産物)を熱変性により一旦一本鎖cDNAにした後、オーバーラップしている構造をアニーリングさせることで、5'及び3'-RACE産物を融合させる。相補鎖を合成した後、これを鋳型として今度は、APとpoly A-tailの部分にあらかじめ組み込まれているcDNA合成プライマー (CDS)によって、LD PCRを行うことにより、最終的に、5'及び3'両端を含む完全長のcDNAを得ることができる。詳細については〔実施例4〕に記す。

10 【0036】VI. cDNAクローンの解析

(1) サザンブロットによる解析

サザンブロットとは、制限酵素などによって切断したDNA断片の中から目的とする遺伝子を検出することを目的とする手法である。まず、DNA断片をアガロース・ゲルの電気泳動でサイズの違いに従い分離する。次に、アルカリ及び塩によってDNAを変性させ、ニトロセルロース・フィルターに移す。このフィルターを³²Pで標識したプローブとハイブリダイズさせ、フィルターをオートラジオグラフィーにかける。その結果、ハイブリダイズしたDNA断片が検出される。この方法を用いることで、遺伝子数(コピー数)、ファミリーの存在等を知ることができる。プローブとしては、TAIL-PCR法で得られたDNA又はそれをもとにMarathon Kitを用いて得られた完全長cDNAが用いられる。詳細については〔実施例5〕に記す。

30 【0037】(2) ノーザンブロットによる解析

ノーザンブロットとは、RNAの混合物の中から特定のRNAを検出するための手法であり、また、目的のRNAのサイズ及び量を検出することを目的として使用される手法である。細胞又は組織からのRNAの抽出は高濃度グアニジンチオシアネートを用いて行い、フェノール/クロロホルムで除蛋白したのち、アルコール沈殿でRNAを精製する。アガロースゲル電気泳動でRNAをサイズの違いで分画し、アルカリ及び塩により変性させる。次に、ニトロセルロース・フィルターに移し、³²PでラベルしたcDNAプローブとハイブリダイズさせる。オートラジオグラフィーで感光させ、プローブとハイブリダイズした目的のRNAを検出する。

【0038】この方法により、プローブに用いたcDNAの配列に対応するmRNAが検出され、かつ目的の遺伝子の完全長のサイズ、及び相対的な発現量を知ることができる。プローブとしては、TAIL-PCR法で得られたcDNA断片又はそれをもとにMarathon cDNA Kitを用いて得られた完全長cDNAが用いられる。詳細については〔実施例6〕に記す。

【0039】VII. 形質転換体の作製

精製された遺伝子を、適当なベクターDNAの制限酵素部位又はマルチクローニングサイトに挿入して組換え体DNAを作成し、当該組換え体DNAを用いて、宿主細胞を形質転換する。DNA断片を挿入するためのベクターDNAは、

宿主細胞で複製可能なものであれば特に限定されず、例えば、プラスミドDNA、ファージDNA等が挙げられる。宿主細胞が大腸菌である場合は、プラスミド pUC118 (宝酒造社製)、pUC119 (宝酒造社製)、pBluescript SK+ (Stratagene社製)、pGEM-T (Promega社製) 等が使用できる。

【0040】宿主細胞としては、真核細胞及び原核細胞のいずれをも用いることができる。真核細胞としては動物、酵母等の細胞が、原核細胞としては大腸菌等が挙げられる。例えば、大腸菌XL1-Blue (Stratagene社製)、JM109 (宝酒造社製) 等を用いることができる。

【0041】ベクターDNA としてプラスミド DNAを用いる場合、例えばEcoRI DNA断片を挿入する際、プラスミドDNAを制限酵素EcoRI (New England Biolab; NEB 社製) を用いて消化し、自己連結を防ぐためCIP (calf intestine phosphatase) 等で処理をしておく。次いで、DNA断片と切断されたベクターDNAとを混合し、これに、例えばT4 DNAリガーゼ (宝酒造社製) を作用させて組換え体DNAを得る。このようにして得られた組換え体DNAを、宿主細胞、例えば大腸菌XL1-Blue等へ形質転換することにより、目的の遺伝子を含む遺伝子断片を保有する形質転換体のコロニーを得ることができる。

【0042】本発明では、形質転換は、例えばHanahanの方法 [Techniques for Transformation of E. coli In DNA Cloning, vol. 1, Glover, D.M. (ed.) pp109-136, IRL Press (1985)] により行うことができる。上記形質転換株のスクリーニングは、目的遺伝子の一部を含む DNA断片をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーション、あるいは、目的の遺伝子の塩基配列に基づいた5' プライマー (FP) を合成し、次いで、相補鎖DNAの塩基配列に基づいた3' プライマー (RP) を合成し、これらのプライマーを用いたPCR法により、目的とする遺伝子を含むコロニーを選択することができる。このようにして本発明の遺伝子を保有する形質転換株を得ることができる。

【0043】VIII. WS-3遺伝子がコードするポリペプチドの生産

前記のようにして得られた組換え体DNAを保有する原核又は真核細胞を培養すれば、本発明の遺伝子がコードするポリペプチドを生産することができる。培養方法は、通常の固体培養法でもよいが、液体培養法を採用することが好ましい。

【0044】組換え微生物を培養する培地としては、例えば酵母エキス、ペプトン、肉エキス等から選ばれる1種以上の窒素源に、リン酸水素二カリウム、硫酸マグネシウム、塩化第二鉄等の無機塩類の1種以上を添加し、更に必要により糖質原料、抗生物質、ビタミン等を適宜添加したものが用いられる。また、必要により培地にIPTG等を添加して、遺伝子の発現を誘導してもよい。培養開始時の培地のpHは7.2 ~ 7.4 に調節し、培養は通常36

~38℃、好ましくは37℃前後で14~20時間、通気攪拌培養、振盪培養等により行う。

【0045】培養終了後、培養物より本発明のポリペプチドを採取するには、通常のタンパク質精製手段を用いることができる。すなわち、リゾチーム等の酵素を用いた溶菌処理、超音波破碎処理、磨砕処理等により菌体を破壊し、本発明の遺伝子がコードするポリペプチドを菌体外に排出させる。次いで、濾過又は遠心分離等を用いて不溶物を除去し、粗ポリペプチド溶液を得る。

10 【0046】上記粗ポリペプチド溶液から、該ポリペプチドをさらに精製するには、通常のタンパク質精製法を使用することができる。例えば、硫酸塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、電気泳動法等を、単独又は適宜組み合わせることにより行う。

【0047】IX. モノクローナル抗体の作製

本発明のWS-3遺伝子がコードするポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体は、以下のようにして得ることができる。

20

(1) 抗原の調製

前記の方法 (VIII参照) により得られたポリペプチドを緩衝液に溶解し、次いでアジュバントを添加する。アジュバントとしては、市販のフロイント完全アジュバント、フロイントの不完全アジュバント等が挙げられ、これらの何れのものも混合してもよい。

【0048】(2) 免疫及び抗体産生細胞の採取

上記のようにして得られた免疫原を哺乳動物、例えばラット、マウスなどに投与する。抗原の免疫量は1回に動物1匹当たり、10~500 µg用いる。免疫部位は、主として静脈内、皮下、腹腔内に注入する。また、免疫の間隔は特に限定されず、数日から数週間間隔で、好ましくは1~3週間間隔で、2~5回、好ましくは3~4回免疫する。最終の免疫日から2~7日後、好ましくは4~5日後に、抗体産生細胞を採集する。抗体産生細胞としては、脾臓細胞、リンパ節細胞、末梢血細胞等が挙げられるが、脾臓細胞又は局所リンパ節細胞が好ましい。

【0049】(3) 細胞融合

抗体産生細胞と融合させるミエローマ細胞として、マウスなどの動物の一般に入手可能な株化細胞を使用する。使用する細胞株としては、薬剤選択性を有し、未融合の状態では選択培地 (HAT培地: ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミンを含む) で生存出来ず、抗体産生細胞と融合した状態でのみ生存出来る性質を有するものが好ましい。ミエローマ細胞の具体例としては、P3U-1 (大日本製薬社製) などのマウスミエローマ細胞株が挙げられる。

【0050】次に、上記ミエローマ細胞と抗体産生細胞とを細胞融合させる。細胞融合は、血清を含まないDME M、RPMI-1640 培地などの動物細胞培養用培地中で10°細

50

胞/mlの抗体産生細胞と 2×10^5 細胞/mlのミエローマ細胞とを等容量混合し、融合促進剤存在のもと融合反応を行う。細胞融合を促進させるためには、平均分子量1,500ダルトンのポリエチレングリコール等を使用することができる。また、電気刺激（例えばエレクトロポレーション）を利用した市販の細胞融合装置を用いて抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることもできる。

【0051】(4) ハイブリドーマの選択及びクローニング

細胞融合処理後の細胞から目的とするハイブリドーマを選別する。その方法として、細胞懸濁液を例えばウシ胎児血清含有 RPMI-1640培地などで適当に希釈後、マイクロタイプレート上に5~10細胞/ウェル程度まき、各ウェルに選択培地を加え、以後適当に選択培地を交換して培養を行う。その結果、選択培地で培養開始後、約14日前後から生育してくる細胞をハイブリドーマとして得ることができる。

【0052】増殖してきたハイブリドーマの培養上清中に、目的とする抗体が存在するか否かをスクリーニングする。ハイブリドーマのスクリーニングは通常の方法に従い、特に限定はされない。例えば、ハイブリドーマとして生育したウェルに含まれる培養上清の一部を採集し、酵素免疫測定法（EIA; enzyme immuno assay）、RIA (radio immuno assay) 等によって行うことができる。融合細胞のクローニングは、限界希釈法等により行い、最終的にモノクローナル抗体産生細胞であるハイブリドーマを樹立する。

【0053】(5) モノクローナル抗体の採取
樹立したハイブリドーマからモノクローナル抗体を採取する方法として、通常の細胞培養法又は腹水形成法等が採用できる。細胞培養法においては、ハイブリドーマを10%ウシ胎児血清含有 RPMI-1640培地、MEM 培地又は無血清培地等の動物細胞培養培地中で、通常の培養条件（例えば37℃、5%CO₂濃度）で10~14日間培養し、その培養上清から抗体を取得することができる。

【0054】腹水形成法の場合は、ミエローマ細胞由来の哺乳動物と同種系動物の腹腔内にハイブリドーマを約 5×10^6 個投与し、ハイブリドーマを大量に増殖させる。そして、1~2週間後に腹水または血清を採集する。上記抗体の採取方法において、抗体の精製が必要とされる場合は、硫酸塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲルクロマトグラフィーなどの公知の方法を適宜に選択して、又はこれらを組み合わせることにより精製することができる。

【0055】X. ポリクローナル抗体の作製

(1) 抗原の調製

前記の方法（VIII参照）により得られたポリペプチドを緩衝液に溶解し、次いでアジュバントを添加する。アジュバントとしては市販のフロイント完全アジュバント、

フロイント不完全アジュバントを用いる。

【0056】(2) 免疫

免疫する動物は、通常、ウサギ、モルモット、ヤギ、ヒツジなどを用いる。ウサギを例にとると、ウサギの足趾に、通常100 μ gから500 μ gのポリペプチドをフロイント完全アジュバントとともに皮下注射する。二週間後に同量の抗原をフロイント不完全アジュバントと混合して筋肉内注射をする。さらに二週間後に筋肉内注射を繰り返し、最終免疫の一週間後に耳より部分採血してEIA法等により抗体価を測定する。抗体価が目的の値に達していれば全採血し、抗体価が低ければ筋肉内注射を繰り返し、抗体価が目的の値に達するまで免疫を繰り返す。血清から硫酸分画による抗体の精製は、モノクローナル抗体の項（IX参照）で述べた方法を採用できる。

【0057】XI. WS領域に存在するWS-3遺伝子及びその遺伝子がコードするポリペプチドの検出用試薬

WS-3遺伝子は、種を越えて比較的良く保存され（図4C及び図4D）、かつ、ヒトのさまざまな組織において高い発現が認められたことから（図5A）、生体の基本的な恒常性の維持に関わる未知の構成成分をコードしている遺伝子の一つであることが強く示唆され、この遺伝子の発現制御の理解は、生体の恒常性維持を司るメカニズムを解明するうえで有用であり、また、生体の基本的な恒常性を維持するための新規医薬品の創製にも有用であると共に、ウェルナー症候群病発症との関連を解明するための研究にも有用である。

【0058】本発明の遺伝子上記に関連する検出用試薬として使用する場合は、クローニングされたWS-3遺伝子の少なくとも一部分を含むオリゴヌクレオチドをプローブとしてハイブリダイゼーションを行い、サザン又はノーザンブロット法により検出することができる。なお、オリゴヌクレオチドプローブとしては、DNAプローブ、RNAプローブが挙げられる。また、本発明の遺伝子をコードするポリペプチドに対するポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を検出用試薬として使用する場合は、EIA、RIAまたはウエスタンブロット解析により、検出することができる。

XII. トランスジェニックマウス

(1) 導入する遺伝子の構築

マウスに導入する遺伝子については、上流のプロモーターと下流のpoly-Aシグナルを含むゲノムDNAを使用するか、あるいは両者に挟まれたcDNAを使用するかのいずれかである。WS-3遺伝子を過剰発現しうるトランスジェニックマウスを作製すれば、WS-3遺伝子の生物学的な作用を解析するためのモデル動物（実験動物）に使用できる可能性が高い。

【0059】トランスジェニックマウスの遺伝子としては、WS-3遺伝子を過剰発現させるようなベクター、逆にその発現を抑制するようなアンチセンスのベクターの二つが考えられる。いずれの場合にも、遺伝子の選択のた

めの、ポジティブ選別用の薬剤（例えば、ネオマイシンなど）耐性遺伝子を連結させておく。

【0060】(2) 細胞への遺伝子の挿入

細胞への遺伝子の挿入は、従来より使用されている受精卵に、直接DNAを注入する方法も使用し得るが、最近開発された胚性幹細胞（embryonic stem cell: ES 細胞）は、培養が可能で、しかもこの細胞からマウスを発生させることができるという利点を有しているため、各種ES細胞を用いる方法がより効率的で好ましい。ES細胞としては、例えばTT2細胞が挙げられる（相沢慎一、ジーンターゲットティング、1995年、羊土社）。エレクトロポレーションによりWS-3遺伝子を含む上記ベクターDNAをES細胞へ導入し、ネオマイシンでポジティブ選別し、目的の変異ES細胞を得る。

【0061】(3) 胚胎盤胞又は8細胞期胚への注入
上記ES細胞を胚胎盤胞又は8細胞期胚へ、毛細管を用いて注入する。

【0062】(4) 仮親への移植

ES細胞を注入した8細胞期胚は直接仮親の卵管に移植するか、一日培養して胚盤胞まで発生したものを子宮に移植する。ES細胞を注入した胚盤胞は直接子宮へ移植する。

【0063】(5) キメラマウスの解析

妊娠したマウスに出産させる。子の毛色によりキメラの程度を判定し、その程度の高いもの同士を交配させる。生まれた子マウスの尾を小さく切り、PCR法により変異アレルの伝達を調べる。ヘテロマウス同士を交配して、ホモ体をつくり、それを解析する。

【0064】XIII. ノックアウトマウス

ヒトWS-3遺伝子に相当するマウスWS-3遺伝子を含むゲノムDNAをPCRまたはゲノムライブラリーから得、そのいずれかのエキソンの中にneo耐性遺伝子を挿入したベクターを構築する。この操作によりこのエキソンの機能は破壊される。これと同時に、このベクターの中にネガティブ選別用のチミジンキナーゼ(tk)遺伝子又はジフテリア(DT)毒素遺伝子を繋げておく。エレクトロポレーションにより該ベクターDNAをES細胞に導入する。次に、この細胞をポジティブ選別用のネオマイシン及びネガティブ選別用の核酸類似体PIAU（fluoriodoadenosyluracil）、又はジフテリア毒素の存在下で培養する。この操作により非相同組換えを起こしたジフテリア毒素感受性細胞と、組換えを全く起こさないG418感受性細胞が除去され、相同組換えを起こした細胞のみが残る。この細胞では、破壊されたエキソンを含む遺伝子がノックアウトされる。得られた細胞をマウスの胚胎盤胞又は8細胞期胚に注入し、その後はトランスジェニックマウスの操作に準じて操作し、ダブルノックアウトマウスを得ることができる。

【0065】XIV. 遺伝子の発現レベルを上昇又は下降するように修飾された遺伝子が導入されたマウス

本発明においては、遺伝子の発現を正常に調節しているいくつかの重要な部位（エンハンサー、プロモーター、イントロン等）の一部に変異を導入、除去あるいは新たに付加することにより、本来の遺伝子の発現レベルと比較し、人工的に上昇又は下降するように修飾することができる。

【0066】

【発明の実施の形態】以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例に限定されない。

【実施例1】ゲノムDNA及びRNAの調製並びにP1及びPAC DNAの精製

I. ゲノムDNA及びRNAの調製

(1) 細胞サンプルの収集とゲノム DNA調製

ヒト血液リンパ球からのゲノム DNA調製は、Molecular Cloning (Sanbrook, Fritschand Maniatis, Cold Spring Harbor 出版) に記載された方法により行った。まず、新鮮な血液 (10ml) を、80mlの 0.32M Sucrose、10 mMのTris-HCl緩衝液 (pH 7.5)、5 mM MgCl₂、及び1% Triton X-100 を含む溶液と混合して溶血し、氷上に20分間静置後、遠心し、リンパ球を含むペレット画分を得た。このペレットを2.25mlの0.075M NaCl 及び0.025M EDTA を含む溶液に懸濁し、0.25mlの2 mg/ml プロテイナーゼ K、5% SDS及び10mM Tris-HCl緩衝液 (pH 8.0) を加え、37℃で一晩インキュベートした。この後、5ml からなる1容のフェノールと1容のクロロホルム・イソアミルアルコール (24:1) の混液とを加え、静かに回しながらゲノムDNAの抽出を行った。遠心後 (3,000rpm, 10分)、上清画分を分取し、フェノール/クロロホルムによる抽出を繰り返した。遠心分離により得られる上清に、20%容の3M 酢酸ナトリウム液 (pH 5.2) を加え、更に2.5倍容のエタノールを加え、ゲノムDNAを析出させた。綿状のDNAをガラスパスツールピペットで巻取り、10mM Tris-HCl (pH 8.0) 及び0.2mM EDTAを含む1.25 mlのバッファーに溶かした。

【0067】ヒト胎盤組織からのゲノムDNAの精製は、健康人妊婦より得た新鮮な胎盤をドライアイス上で凍結させ、スライサーを用いて極く薄い切片にするか、又は細粉したものを材料として用いて行った。細かくした凍結胎盤破片から、Gross-Bellardらの方法 [Eur. J. Biochem. 36, 32-38 (1973)] に従ってゲノムDNAを抽出・精製した。

【0068】(2) 細胞株の確立及び全RNAの調製

臨床診断的に認定されたウェルナー症患者（以下、WS患者と記す）からパイオプシーにより得られる皮膚組織切片をもとにWS繊維芽細胞株を確立し、全RNA及びpoly A⁺ 含有mRNA（以下 poly A⁺ mRNA と記す）を精製した。同様に、健康人皮膚組織切片からの健康人繊維芽細胞株の確立と共にRNAを精製した。

【0069】mRNAの調製は、以下の方法で行った。WS患

者又は健康人由来の培養ヒト繊維芽細胞をトリプシンによりペトリ皿からはがし、PBS で十分に洗浄後、6M グアニジウムチオシアネート溶液中でホモジナイズし、Chirgwinらの方法[Biochemistry 18, 5294-9299 (1979)]に従い、塩化セシウム平衡密度勾配遠心法により全RNAを沈殿として分離した。分離後、フェノール抽出、エタノール沈殿等により全RNAを精製した。polyA⁺ mRNA 群を得る場合には、全RNAにオリゴ(dT)を共有結合で表層にもつラテックス粒子、オリゴテックス(dT)-30(宝酒造社製)を加え、Kuribayashi-Ohtaらの方法[Biochem. Biophys. Acta. 1156, 204-112 (1993)]に従い、パッチ法によるアフィニティクロマトグラフィーにより精製した。これらの繊維芽細胞からのmRNAは、逆転写酵素を用いてcDNAを調製するための試料として用いるのみならず、WS患者のある特定のmRNAが質的(サイズ及びファミリーの存在)及び量的(発現量及びコピー数)に健康人と比較して変動しているか否かをノーザンブロット解析する際の試料としても用いることができる。

【0070】II. P1及び PAC DNAの精製

純度の高いP1及びPAC DNA はCsCl密度勾配遠心法で分離精製し、WS領域の遺伝子物理地図の作成、遺伝子配列の解読、FISHによる解析及びエキソントラッピング法の材料に用いた。

【0071】(1) IPTG刺激による大腸菌体内P1/PACコピー数の増大・誘導法

P1/PACファージクローンからの DNAの回収・精製は、Smoller ら[Chromosoma 100, 487-494 (1991)]によって報告された方法に変更を加えて行った。単一P1/PACファージクローンを含む大腸菌(E. coli NS3529)コロニーを最終濃度25 µg/mlのカナマイシンを含む33mlのLB培養液中に懸濁し、37℃で一晩振盪培養した。翌日、同濃度のカナマイシンを含む1LのLB培養液中へ移し、1.5時間振盪培養後、最終濃度0.5 mMとなるようにIPTGを加え、引き続き5時間振盪培養した。

【0072】(2) CsCl密度勾配遠心法によるP1/PAC DNAの精製

P1/PAC DNAは、上記(1)に記載した方法により得られた菌体から、通常のアルカリ-SDS法[Birnboim and Doly, Nucleic Acids Res. 7, 1513-1523 (1979)]により調製し、CsCl密度勾配遠心法により精製した。

【0073】冷却遠心分離(3,500rpm×15分)により回収した菌体に、50mlの50mM Sucrose-10mM EDTA-25mM Tris-HCl(pH 8.0)と、50mg/ml のlysozyme溶液を1.5 ml加え穏やかに室温で5分インキュベートした。引き続き、100ml の0.2M NaOH-1% SDS溶液を加え穏やかに氷上で5分インキュベートした。さらに、75mlの3M KAc-11.5%氷酢酸を加え穏やかに氷上で5分インキュベートした。冷却遠心分離(4,000 rpm×15分)により上清を回収し、そこに最終濃度50 µg/mlとなるようにRNase溶液を加え、37℃で1時間インキュベート後同量の2-propanolを加

え、-20℃で1時間放置した。冷却遠心分離(6,000rpm×15分)後、デカンテーションにより上清を除去し、P1/PAC DNAを含む沈殿を70%EtOHで洗浄後完全に風乾させた。6mlの10mM Tris-HCl-1mM EDTA(pH 8.0)を加えて沈殿を溶解させ、そこに6gのCsClを加えて十分に溶解させ、さらに10mg/ml エチジウムブロミドを100 µl 加え、-20℃で20分放置した。冷却遠心分離(6,000rpm×10分)後、上清を回収し、22℃で100,000rpm×4時間以上の超高速遠心により P1/PAC DNA をバクテリアゲノムと分離した。UV照射下P1/PAC DNAを含むバンドを回収後、イソアミルアルコールでエチジウムブロミドを除き、また、2度の透析によりCsClを除き P1/PACDNA を精製した。透析バッファーとして10mM Tris-HCl-1.25mM EDTA(pH 8.0)を用いた。これらのP1/PAC DNAは、コンテイング作成(図1)に使われるとともに【実施例2】に示すエキソントラッピング法に使われた。

【0074】【実施例2】エキソントラッピング法

(1) DNA 断片の調製

以下、一連の操作によりP1/PAC DNA断片からエキソンを回収した。まず、1 µg のP1/PAC DNA断片を、それぞれ100 unitの制限酵素BamHI 及びBgl IIと所定の宝酒造社製のバッファー中で、37℃で3時間インキュベートすることにより切断した。反応液はフェノール/クロロフォルムで処理してDNAを抽出した後、エタノールで沈殿させた。

【0075】(2) エキソントラッピング用の ベクター pSPL3への DNA 断片の挿入

制限酵素Bam HIで切断後、フォスファターゼ(Boehringer Mannheim社製)処理で脱リン酸化された40ngのエキソントラッピング用のベクター pSPL3(GibcoBRL 社製)と、合計100ng の制限酵素Bam HI及びBgl IIにより切断されたP1/PACDNA断片とを、T4 DNAリガーゼとともに所定のバッファーを用いて15℃で16時間反応させ、pSPL3ベクターへP1 DNA断片を挿入した。

【0076】72℃で10分間処理して反応を停止させた後、大腸菌HB101へトランスフォームした。増殖させた大腸菌を回収し、プラスミドをQiagenカラム(Qiagen社製)を用いて調製した。なお、pSPL3ベクターには、HIVのtat遺伝子のスプライシングのためのドナー及びアクセプターの構造が組み込まれており、これを利用して挿入された遺伝子からエキソンがスプライシングされるように設計されている。後述する各種プライマー(配列番号6、7、8)はこのベクター上に設定されたものである。

【0077】(3) Cos-7 細胞へのエレクトロポレーションによるトランスフェクション

Cos-7細胞を直径10cmのシャーレで10%ウシ胎児血清を含むDMEM培地を用いて培養した。0.5%トリプシン溶液を使用して細胞を剥がし、細胞懸濁液にしたのち細胞を冷PBS(Phosphate buffer-Saline, pH 7.2)で洗浄し

た。0.5×10⁶/mlの濃度に細胞数を調整した後、0.4 cmのチェンバーに0.8mlの細胞浮遊液と5 μgプラスミドDNAを加え、10分間氷冷した。Gene Pulser II (BioRAD社製)を用い、電圧1.2 kV、静電容量25 μFDの条件でエレクトロポレーションを行った。再び10分間氷冷したのち、予め37℃に温めた培地へ懸濁しなおし、その後60-72時間培養した。

【0078】(4) 全RNAの抽出

トランスフェクションした細胞は、37℃に温めたPBSで洗浄した後に、0.1%トリブシン溶液で処理し細胞をはがし、懸濁液とした。10%のウシ胎児血清を含むDMEM培地に細胞を懸濁してトリブシンを失活させた後に、いずれもRNaseを含まない、300 μlのTKM溶液(10mM Tris-HCl pH7.5, 10mM KCl, 1mM MgCl₂)及び15 μlの10%Triton X-100溶液を5分毎に氷冷下で順次加え、4℃で1,500 rpm × 5分間遠心して核を除いた。上清を除去し、RNaseを含まない5%SDSを20 μl加えた後に、フェノール/クロロホルムでRNAを抽出した。通常、これら一連の操作により30~50 μgの全RNAを回収することができた。RNAをエタノールで沈殿させた後、ジエチルピロカーボネートで処理し、RNaseフリーとしたMilliQ水50 μlに溶かした。

【0079】(5) RT-PCR

上述した手順で調製した細胞質RNA約3 μg、pSPL3 ベクターに設定されたプライマーSA2(配列番号6)、ジチオスレイトール、dNTP (dATP, dCTP, dGTP及びdTTP)、逆転写酵素用バッファー及び逆転写酵素Super Script IIを含む反応液を42℃で30分反応させ、その後RNase 処理をしてcDNAを調製した。このcDNAをテンプレートとして、pSPL3 ベクターに設定された二つのプライマーSD2(配列番号7)及びSA4(配列番号8)で、Taq DNA ポリメラーゼを用い、PCR 反応を行った。反応は、94℃で1分、60℃で1分、72℃で1分を1サイクルとしてこれを30サイクル行った。

【0080】反応生成物であるDNAをエタノール沈殿させた後に、4%の低融点アガロース電気泳動で高分子と低分子の二分画に分離した。それぞれの画分のゲルを切り出し、70℃で溶解後、Resin column (Promega社製)でDNAを精製した。通常、これら一連の操作により50~2 *

(1) 一次PCR反応;

16.5	μl	pre-mixture-1*
2.5	μl	テンプレート
1.0	μl	AD 1-4 プライマー (100pmol/μl)
全量		20 μl
*pre-mixture-1 (165 μl, 10 samples)		
20.0	μl	10 x バッファー
16.0	μl	dNTPs
30.0	μl	SP-1 プライマー (1pmol/μl)
1.6	μl	Taq (5 U/μl)
97.4	μl	dH ₂ O

* 00ng のDNAを回収することができた。

【0081】(6) 塩基配列決定のためのエキソンDNAの調整

上記DNA溶液、T4 DNAリガーゼ (宝酒造社製)、バッファー (宝酒造社製)、及びpGEM-Tベクター (Promega 社製)を含む溶液を15℃で3時間反応させて、エキソンDNA断片をpGEM-Tベクターに組み込んだ。このベクターで大腸菌JM109をトランスフォームさせ、X-gal、IPTG及びアンピシリン (最終濃度50 μg/ml)を含むLBバクトアガープレートに播いた。白色の大腸菌コロニーについて、pSPL3 ベクターに設定されたSA4(配列番号8)とSD2(配列番号7)の二つのプライマーを用いて PCRを行った。目的のDNA断片の得られたコロニーについて、アンピシリン (最終濃度50 μg/ml)を含むLB培地で、37℃で16時間以上振盪培養し、Kurabo社製のロボット(PI-100Σ)を用いてプラスミドDNAを回収・精製した。

【0082】RNase 処理によりRNAを分解した後、20%ポリエチレングリコール/2.5M NaCl溶液で小分子化合物を除き、エタノール沈殿を行いDNAシークエンス用の試料とした。最終的に塩基配列の確定したエキソンをデータバンクで検索し、既知と未知の遺伝子に大別した。未知のエキソンは、実施例3又は実施例4に記したように、TAIL-PCR又はMarathon™ cDNA Amplification Kitの材料に供した。

【0083】〔実施例3〕TAIL-PCR法によるエキソンの伸長

TAIL-PCR法は、既存配列に隣接する未知の塩基配列を効率良く増幅できる温度非対称交互PCR 法であり [Liu, Y.-G. and Whittier, R.L. Genomics 25, pp674-681 (1995)]、既知配列に特異的な長いプライマーとそれより短い任意のプライマーを用いて、高温と中温アニーリングを交互に行う。さらにこのサイクルをプライマー部位に変化させ、3回繰り返すことにより、目的配列の優先的かつ特異的な増幅を可能にする。具体的には、以下のようなサイクルで、テンプレート cDNAとしては、ヒトHeLa細胞cDNAライブラリー及びヒト唇細胞cDNAライブラリーを用いてPCR反応を行い、cDNA断片の検出と単離を行った。

【0084】

21	22
1 サイクル	1 サイクル
92℃ 2分, 95℃ 1分,	72℃ 2分, 5 サイクル
94℃ 15秒, 65℃ 1分,	(3分かけて) 72℃ 2分, 1 サイクル
94℃ 15秒, 30℃ 3分, 72℃ 2分, 10 サイクル	
94℃ 15秒, 44℃ 1分,	
12 サイクル	
94℃ 5秒, 65℃ 1分,	72℃ 2分, 2 サイクル
94℃ 5秒, 44℃ 1分,	72℃ 2分, 1 サイクル
1 サイクル	
72℃ 5分,	1 サイクル
4℃に保持する。	

【0085】

(2) 二次PCR 反応:

17.4 μ l	pre-mixture-2*
2.0 μ l	一次PCR 産物(100倍希釈)
0.6 μ l	AD 1-4 プライマー (100pmol/ml)
全量	20 μ l
*pre-mixture-2 (174 μ l, 10 samples)	
20.0 μ l	10 x バッファー
2.0 μ l	dNTPs
40.0 μ l	SP-2 プライマー (1pmol/ μ l)
1.6 μ l	Taq (5 U/ μ l)
110.4 μ l	dH ₂ O

1 サイクル	1 サイクル
95℃ 5分,	
10 サイクル	
94℃ 5秒, 65℃ 1分,	72℃ 2分, 2 サイクル
94℃ 5秒, 44℃ 1分,	72℃ 2分, 1 サイクル
1 サイクル	
72℃ 5分	
4℃に保持する。	

【0086】

(3) 三次PCR 反応:

42.0 μ l	pre-mixture-3*
5.0 μ l	二次PCR 産物(100倍希釈)
3.0 μ l	AD 1-4 プライマー (10pmol/ μ l)
全量	50 μ l
*pre-mixture-3 (420 μ l, 10 samples)	
50.0 μ l	10 x バッファー
5.0 μ l	dNTPs
20.0 μ l	SP-3 プライマー (1pmol/ μ l)
3.0 μ l	Taq (5 U/ μ l)
342.0 μ l	dH ₂ O

【0087】(4) 使用したプライマー

AD1	配列番号 9
AD2	配列番号 10
AD3	配列番号 11
AD4	配列番号 12
3' 側への伸長	
3' SP-1	配列番号 13

* 3' SP-2 配列番号 14
 3' SP-3 配列番号 15

【0088】通常、7mlを1.5 %アガロースゲルにより解析し、特異的な増幅が認められた場合、5mlを直接、塩基配列の解析に用いた。このようにして得られたDNA配列が、真にWS領域由来の遺伝子断片であることを確認するため、pGEM-Tベクター (Promega社製) を用いてク

* 50

ローニングし、以下に記した方法により、塩基配列の決定を行った。

【0089】塩基配列の決定

目的とする DNA断片をpGEM-Tベクター (Promega 社製) に挿入し、大腸菌で増殖させた後、プラスミドをロボット (Kurabo 社製 PI-100Σ) を用いたアルカリ法により精製する。得られた精製プラスミドを RNaseで処理した後、ポリエチレングリコール/食塩水の溶液で処理して小分子を除き、DNA を精製する。

【0090】精製されたDNA を鋳型DNA として、非標識プライマー、4種類の蛍光標識ヌクレオチド-5'-トリフォスフェイト、及び Taqポリメラーゼを加えた反応系で PCRを行う。この反応では、無作為に蛍光色素の入った DNA断片が合成され、それをシークエンサーで解析することで、最終的には連続した塩基配列を決定することができる。DNA の塩基配列は、Applied Biosystem 社製の自動DNAシークエンサー (モデルABI 373)を用いて行うことができる。

【0091】得られたcDNAクローンは、最終的にPCR 及びFISHにより正確にその位置を確認すると共に下記のプライマーを用いて塩基配列を決定した。

M13F側 配列番号20

M13R側 配列番号21

SP6 側 配列番号4

T7側 配列番号5

【0092】〔実施例4〕 Marathon™ cDNA Amplification Kitを用いた WS-3 cDNAのクローニング
株式会社エイジーン研究所が所有するWS領域内の構成PAC クローン(#6207) からエキソントラッピング法で単離されたWS-3遺伝子の部分断片をTAIL-PCR法により伸長さ

* せ、引き続き、Marathon™ cDNA Amplification Kitを用いて、5'-, 3'-両端を含む完全長のWS-3 cDNA クローンを得た。具体的には、以下のようなサイクルで、テンプレートとして、ヒト Heart cDNA ライブラリーを用いてPCR 反応を行い、WS-3 cDNA断片の検出と単離を行った。

【0093】まず、TAIL-PCR法により得られたWS-3 cDNA の部分DNA 断片配列の一方の鎖上にAG1284 (配列番号18)、AG1285 (配列番号19) 及びAG1286 (配列番号20)、相補鎖の cDNA 上に AG1288 (配列番号21) 及びAG1289 (配列番号22) の計5個のnested gene specificプライマー (GSP)を作製した。Marathon Ready™ cDNA Amplification kit によって、5'-RACE および 3'-RACEのそれぞれの産物が得られた場合、互いに向き合う最も内側のプライマー [AG1286 (配列番号20) とAG1289 (配列番号22)]同士の間に54bpのオーバーラップができるようにデザインしてあり、この部分を互いにアニーリングさせる (Fusion) ことで完全長のcDNAが得られるようになっている。以下に、ヒト心臓cDNA Ready™をテンプレートとして、(1)5'-RACE、(2)3'-RACEおよび (3)5'-RACE 産物と 3'-RACE 産物の融合について順に説明する。

(1) 5'-RACE 産物の増幅

[1st LD PCR]

アダプタープライマー 1 (配列番号23)とAG1288 (配列番号21)を使って、以下の組成及びサイクルプログラムでヒト心臓cDNA Ready™をテンプレートにして PCR反応を行った。PCR の反応条件 (試薬組成及びサイクル) を表1及び2に示す。

【0094】

【表1】

試 薬 組 成

5	μl	ヒト心臓cDNA Ready™
1	μl	アダプタープライマー 1 (10 μM)
1	μl	遺伝子特異的プライマー (AG1288:10 μM)
43	μl	Master Mix./反応
	36	μl dH ₂ O
	5	μl 10× Klen Taq PCR バッファー
	1	μl 10mM dNTP
	1	μl 50× Klen Taq DNA ポリメラーゼ

全量 50 μl

【0095】

【表2】

25

サイクルプログラム		
94℃	2 分	1 サイクル
94℃	30 秒	30 サイクル
60℃	30 秒	
68℃	4 分	
4℃	ソーキング	

試 薬 組 成

5	μl	1st PCR 産物 (50倍希釈)
1	μl	アダプタープライマー 2 (10 μM)
1	μl	遺伝子特異的プライマー (AG1289; 10 μM)
43	μl	Master Mix. (表1と同様)

全量 50 μl

【0098】

【表4】

サイクルプログラム		
94℃	2 分	1 サイクル
94℃	30 秒	20 サイクル
60℃	30 秒	
68℃	4 分	
4℃	ソーキング	

試 薬 組 成

5	μl	ヒト心臓cDNA Ready™
1	μl	アダプタープライマー 1 (10 μM)
1	μl	遺伝子特異的プライマー (AG1284; 10 μM)
43	μl	Master Mix. (表1と同様)

全量 50 μl

【0102】

【表6】

サイクルプログラム		
94℃	2 分	1 サイクル
94℃	30 秒	30 サイクル
60℃	30 秒	
68℃	4 分	
4℃	ソーキング	

26

【0096】 [2nd LD PCR]

1st PCR 産物を、1×TE (pH8.0) で50倍希釈したもの5 μlをテンプレートにして、nestedプライマー [AP2(配列番号24), AG1289(配列番号22)]でPCR 反応を行った。PCR の反応条件 (試薬組成及びサイクル) を表3及び4に示す。

【0097】

【表3】

* 【0099】 2nd PCR 産物10 μlを1.2%アガロースゲル

* 電気泳動後、EtBr染色した。その結果、アダプターを含めてWS-3 cDNA の5' 端部分 (約400 bpの断片) の増幅を確認した。

【0100】 (2) 3'-RACE 産物の増幅

[1st LD PCR]: アダプタープライマー 1 (配列番号23) とAG1284 (配列番号18) を使って 5'-RACE同様、ヒト心臓cDNA Ready™をテンプレートにしてPCR 反応を行った。PCR の反応条件 (試薬組成及びサイクル) を表5及び6に示す。

30 【0101】

【表5】

【0103】[2nd LD PCR]: 1st PCR 産物を、1×TE (pH8.0)で50倍希釈もの 5μlをテンプレートにして、nestedプライマー [AP2 (配列番号24), AG1285(配列番号19)]でPCR反応を行った。GSP に AG1285(配列番号19)を使う以外は、(1)5'-RACE, [2nd LD PCR] の項に記載の方法と同様にしてPCRを行った。

【0104】[3rd PCR]: 2nd PCR 産物をさらに50倍希釈し、5μlをテンプレートにnestedプライマー[AP2 (配列番号24), AG1286 (配列番号20)]でPCR反応を行った。GSP にAG1286 (配列番号20)を使う以外は、[2nd LD PCR]に記載の方法と同様にPCRを行った。3rd PCR 産物 15μlを 1.2%アガロースゲル電気泳動にかけた後、EtBr染色した結果、アダプターを含め、約 800 bpのWS-3 cDNA 3'-端部分の特異的増幅を確認した。

【0105】(3) 融合による完全長WS-3 cDNA の増幅 (1) と (2) の各 5'-、3'- 端を含む2種類の断片(5'-、3'- RACE産物)を熱変性により一旦一本鎖 cDNA にした後、オーバーラップしている構造をアニーリングさせることで、5'- 及び 3'-RACE産物を融合させた。相補鎖を合成した後、これを鋳型として今度は、APと poly A -t ail の部分にあらはじめ組み込まれている cDNA synthesis プライマー[CDS、(配列番号25)]によって、Long-Distance PCR を行うことにより、最終的に、5'-、3'- 両端を含む完全長の WS-3 cDNAクローンを得ることができた。PCR の反応条件 (試薬組成及びサイクル) を表7及び8に示す。

【0106】

【表7】

試 薬 組 成		
8 μl	5' RACE産物 (AP2/AG1289)	
8 μl	3' RACE産物 (AG1286/AP2)	
1.1 μl	dH ₂ O	
2 μl	10×PCR バッファー	
0.5 μl	10mM dNTP	
0.4 μl	50× Klen Taq DNA ポリメラーゼ	
全量 20 μl		

【0107】

【表8】

サイクルプログラム

94℃	2 分	1 サイクル
94℃	30 秒	10 サイクル
68℃	4 分	
4℃		ソーキング

10

* 【0108】[PCRによる完全長cDNAの生成]: サイクル反応後、反応液を 1×TEで 100倍希釈して、この 5μlをテンプレートとする。完全長の cDNA を増幅するため、AP2 (配列番号24) およびCDS(配列番号25) プライマーによって以下の反応を行った。PCR の反応条件 (試薬組成及びサイクル) を表9及び10に示す。

【0109】

【表9】

20

試 薬 組 成		
5 μl	融合産物(100倍希釈)	
1 μl	アダプタープライマー-2 (10 μM)	
1 μl	CDS プライマー(10 μM)	
2 μl	10×PCR バッファー	
43 μl	Master Mix. (表1と同様)	
全量 50 μl		

【0110】

30 【表10】

サイクルプログラム		
94℃	2 分	1 サイクル
94℃	30 秒	15 サイクル
68℃	4 分	
4℃		ソーキング

40

* 【0111】最後に、この反応産物15μlを1.2%アガロースゲル電気泳動して、アダプターとCDS を含む、全長約 1.1 kbpの全WS-3 cDNA が増幅できたのを確認した。この完全長のcDNAは、アダプターおよび CDSプライマー内部にあらはじめ用意されているNotI制限酵素部位で消化した後、pBluescriptII KS(+)ベクター(Stratagene社製)にサブクローニングし、完全長のcDNA配列を決定した。

50 【0112】[実施例5] WS-3遺伝子のサザンブロットによる解析

標識された核酸プローブと相補的な塩基配列を持つWS-3 遺伝子DNAの領域を同定するために、次のようにサザンハイブリダイゼーションを行った。

(1) ヒト胎盤及びマウス肝臓由来のゲノムDNA 制限酵素 (BamHI, BglII, EcoRI, HindIII及び PstI) で消化したヒト胎盤及びマウス肝臓由来のゲノムDNA 10 μ gを0.8%アガロースゲル電気泳動により分離した。ゲルを0.5N NaOH-1.5M NaCl溶液150 mlに浸し、30分間ゆっくり振盪し、アルカリ変性させた。ゲルを脱イオン水で軽く洗い、0.5M Tris-HCl (pH 7.5) 、1.5M NaCl溶液150 mlに浸し、30分間ゆっくりと振盪し、中和反応させた。

【0113】一方、ゲルと同じ大きさに切ったニトロセルロース膜 (Amersham社製) を蒸留水にて湿らせた後、2×SSC (0.3M NaCl, 0.03M クエン酸ナトリウム (pH 7.0)) に浸した。トレイに20×SSC 溶液を200 ml入れ、スポンジを浸し、ついで適当な大きさの濾紙 (Whatmann 3 MM) を2×SSCに浸した後、スポンジの上に載せた。

【0114】つぎにこの濾紙上に、前記のように処理したアガロースゲル、その上にニトロセルロース膜を載せ、さらに同じ大きさの濾紙、ペーパータオルの束、重しを載せ、一晚トランスファーさせた。トランスファー終了後、紫外線照射 (波長260 nm, 120 mJ/cm²) によりゲノムDNAをニトロセルロース膜へ固定し、株式会社エイジーン研究所が所有するヒト染色体8p11.2-p12.1コンティグの構成 PACクローン (#6207) よりMarathon™ cDNA Amplification Kit 法で単離された完全長WS-3 cDNA断片を後述の方法に従い放射性ラベルしてWS-3遺伝子の検出プローブとし、最終的にKodack社製の X線フィルムによるオートラジオグラフィーにより検出した (図4A及び図4B)。なお、WS-3プレハイブリダイゼーションバッファーには5×SSPE、10×Denhardt's溶液、2%SDS、100 μ g/mlの変性サケ精子DNA断片を含むものを用いた。

【0115】ヒト胎盤 (レーン1~5) 及びマウス肝臓 (レーン6~10) 由来のゲノムDNAを下記の制限酵素で消化し (レーン1及び6はBamHIで消化したもの、レーン2及び7はBglIIで消化したもの、レーン3及び8はEcoRIで消化したもの、レーン4及び9はHindIIIで消化したもの、レーン5及び10はPstIで消化したものである)、アガロース電気泳動で分離後、ニトロセルロース膜にプロットした。これに、³²Pで標識した完全長WS-3 cDNAをプローブとしてハイブリダイズし、検出した。その結果を図4A及び図4Bに示す。この結果より、WS-3遺伝子は、ヒトゲノム上でファミリーを形成して存在している可能性が示唆される。

【0116】(2) Zoo Blot 9種類のゲノムDNA各4 μ gをアガロース電気泳動し、ナイロン膜にプロットしたプライメドフィルター (Clontech社製) を使用した (図4C及び図4D)。WS-3

遺伝子の検出プローブは、前述と同様で、ハイブリダイゼーション及び洗浄条件は、Clontechのプロトコールに従った。

【0117】図4C及び図4Dより、WS-3遺伝子は、種を越えて良く保存されていることがうかがえる。なお、ゲノムDNAの起源は、aがヒト、bがサル、cがラット、dがマウス、eがイヌ、fがウシ、gがウサギ、hがニワトリ、iが酵母である。

【0118】なお、図4A及び図4B、また、図4C及び図4Dは、それぞれ同一のサンプルをX線フィルムで1日 (図4A及び図4C)、及び7日間 (図4B及び図4D) 感光後、現像した写真である。

【0119】〔実施例6〕WS-3遺伝子のノーザンプロットによる解析

(1) WS-3遺伝子のノーザンプロットによる解析

本発明に於いては、グリオキサール法により全RNAをアガロース電気泳動し、ナイロン膜にトランスファーした後、cDNAプローブを³²P-dCTPでラベルして、これをハイブリダイズさせた。ここでは実際に以下のRNAサンプルを使ったWS-3cDNA プローブによる解析を示す (図5B及び図5C)。

【0120】(i) 全RNAサンプル

健康人繊維芽細胞由来

・CS-3F0-250 (大日本製薬社より市販されている新生児皮膚)

・Y.H. (男性、35歳、皮膚)

・H.N. (男性、20歳、皮膚)

WS患者繊維芽細胞由来

・WS6201 (女性、皮膚)

30 ・WS11901 (男性、皮膚)

・WS12301 (男性、42歳、皮膚)

【0121】(ii) ヒト多組織ノーザン (MTN) プロット MTN プロット I 及び II

16種類のヒトの組織・臓器より抽出した polyA⁺ RNA 各2 μ gをアガロース電気泳動して、ナイロン膜にプロットしたプライメドフィルター (Clontech社製) を使用した (図5A)。

【0122】(iii) WS-3 cDNA プローブ

株式会社エイジーン研究所が所有するヒト染色体 8p11.2-p12.1 コンティグの構成

40 PACクローン (#6207) からMarathon™ cDNA Amplification Kit法で単離された完全長WS-3 cDNA の3'-UT 部分を、後述の方法に従い放射性ラベルしてWS-3遺伝子の検出プローブとして用いた。

【0123】(iv) ヒト β アクチンcDNAプローブ ヒト β アクチンcDNA (206~1109ヌクレオチド、904 bp) 部分を、配列番号26及び配列番号27で表されるプライマーを用いたRT-PCRによって増幅、精製し、これをpGEM-Tベクター (Promega社製) ヘサブクローニングした。このcDNAクローンをマルチクローニングサイトのNc

oIとNotI部位で消化して得られる935 bp断片をプローブとした。

【0124】(2) 全RNAブロットニングフィルターの作製

(i) 器具および試薬

電気泳動槽、コーム、スターラーバー等の器具はRNase除去のため、2% Absorb (Dupont社製) に1日浸し、ジエチルピロカーボネート (DEPC) 処理したミリQ水でリンスして用いた。試薬については、すべてDEPC-ミリQ水で調製し、オートクレーブ滅菌して用いた。

【0125】(ii) グリオキサール、ジメチルスルホキシド (DMSO) の脱イオン化処理
飽和グリオキサール (ナカラ社製)、DMSO (ナカラ社製) のそれぞれ20mlに対し、イオン交換樹脂AG501-X8 (BioRad) 20 gを加え30分攪拌する。濾過した濾液に再度、同量の樹脂を加え、pHが6.0以下になるまでこの操作を繰り返す。最後に1mlずつエッペンドルフチューブに分注して-20℃で保存した。

【0126】(iii) アガロースゲルの作製
1g アガロースME (和光純薬社製) を10mMリン酸ナトリウム (pH 6.5) 100mlに溶解して1%アガロースゲルを作製した。ゲルのサイズは7cm(W)×10cm(L)である。

【0127】(iv) RNAのグリオキサール処理
RNAとグリオキサールの水素結合による変性状態ではRNaseによる分解を受けないことから以下の前処理をおこなった。上述の全RNAサンプル20μgをエタノール沈殿し、ペレットを風乾した。これを5μlのDEPC-ミリQ水で溶解し、これに11μlのグリオキサールミックス[58μl脱イオン化グリオキサール、200μl脱イオン化DMSO、8μl 10%SDS、8μl 0.5 Mリン酸ナトリウム (pH 6.5)、用時調製]を加え50℃で20分間インキュベーションした。このときサイズマーカーとしてRNAラダー (GibcoBR L社製) 5μgも同様に前処理した。

【0128】(v) 電気泳動
グリオキサール処理した全RNAサンプルに3μlのゲル・ローディングバッファー[50%グリセロール、10mMリン酸ナトリウム (pH7.0)、0.25%ブロモフェノールブルー、0.25%キシレンシアノールFF]を加え軽く遠心した。これを1%アガロースゲルにローディングして10mMリン酸ナトリウムバッファー (pH 6.5) 中で、80 Vで約2時間、ブロモフェノールブルーがゲルから流れ出る直前まで泳動した。泳動中、pH上昇によりRNAからグリオキサールが解離するのを防ぐために、泳動バッファーをマグネティックスターラーで攪拌し、さらに+、-極のバッファーをペリスタティックポンプによって循環させるようにした。

【0129】泳動後、ゲルを50mM水酸化ナトリウム溶液に20分間浸してグリオキサールを解離させた (この操作をしないと次の染色がうまくいかない)。50mMリン酸ナトリウム (pH 6.5) で20分中和しつつ、1μg/mlのエチ

ジウムブロマイドを添加してRNAの染色をおこなった。染色したサイズマーカーおよびリボソームRNAはスケールとともに写真撮影しておいた。

【0130】(vi) ナイロン膜へのブロットニング
20×SSCバッファーで1晩、キャピラリー法によりナイロン膜、Hybond N+(Amersham社製)へRNAをトランスファーした。ゲルからナイロン膜 (以後、フィルターと呼ぶ) をはがすときにコームの位置にマーカーをつけ、裏・表がわかるようにRNAの転写された面の左上の角を切り落としておいた。2×SSCバッファーでフィルターを10分間リンスし、風乾した。フィルターが乾いた後、312 nmのUV光で15秒間暴露し、RNAをフィルターに固定した。

【0131】(3) ハイブリダイゼーション

(i) プレハイブリダイゼーション

フィルターを弁当箱型ポリスチレン製容器の中で、100 mlのプレハイブリダイゼーションバッファー (WS-3又はβアクトチン・プレハイブリダイゼーションバッファー) に浸して42℃で4時間インキュベーションした。なお、WS-3プレハイブリダイゼーションバッファーには50%ホルムアミド、5×SSPE、10×Denhardt's溶液、2% SDS及び100μg/ml変性サケ精子DNA断片を含むものを、βアクトチン・プレハイブリダイゼーションバッファーには40%ホルムアミド、6×SSC、5×Denhardt's溶液、0.5% SDS及び100μg/ml変性サケ精子DNA断片を含むものを用いた。

【0132】(ii) WS-3 及びβアクトチンcDNAプローブの放射性ラベリング

テンプレートとして前述のWS-3 cDNA断片50ng、プライマーとしてランダムヘキサマー50pmolを用い、ランダムプライマーDNAラベリングキットVer. 2 (宝酒造社製) により[α-³²P]-dCTP (NEN社製、第一化学薬品社製) で放射性ラベルした。βアクトチンプローブも同じ方法でラベルした。

【0133】(iii) ハイブリダイゼーション
プレハイブリダイゼーションバッファーを棄て、新たに50mlのプレハイブリダイゼーションバッファーを加え、気泡がフィルターの下に入りこまないように穏やかに振盪する。これに[³²P]-dCTPで放射性ラベルしたWS-3 cDNAプローブを比活性が約1×10⁶cpm/mlとなるように加え、42℃で16時間ハイブリダイズした。

【0134】ハイブリダイゼーションの後、フィルターを100mlの2×SSC、0.1% SDS溶液で室温、15分のリンスを2回繰り返す、次に100 mlの0.2×SSC、0.1% SDS溶液で室温、15分のリンスを2回おこなった。フィルターはやや湿った状態まで水分を除き、サランラップ (登録商標; 旭化成社製) にはさんでBAS1500システム (富士フイルム社製) によるオートラジオグラフィ解析をおこなった。

【0135】(iv) フィルターからのプローブ除去

フィルターを完全に乾燥させないように注意しながら、0.1×SSC、5% SDS溶液で20分間煮沸した。煮沸後、室温に戻るまで静置し、次いでフィルターを濾紙の上に取出して風乾した。この濾紙について、次のプローブをハイブリダイズする前にオートラジオグラフィーを行うか、又はFuji BAS1500システム（富士フィルム社製）に露光してシグナルが消失したことを確認した。

【0136】(4) Fuji BAS1500システムによる解析
BAS1500 システムは輝尽性蛍光体を用いた放射線エネルギーメモリ型2次元センサー（イメージングプレート；IP）にX線フィルム同様にサンプルを密着露光させ、このIPをHe-Neレーザー光で励起させ露光量に応じて放出される蛍光をPSL(Photo Stimulated Luminescence) というデジタル量に変換して定量した。定量値の直線性は良好でバックグラウンドの減算、指定領域内の放射線強度の計測、比較が行える。

【0137】(i) WS-3 mRNA発現の定量
IPの感度をX線フィルムの約20倍として、WS-3 cDNA プローブをハイブリダイズさせたフィルターをIPに暗黒下で3時間、密着露光させた。その結果、約1.0kbpの明瞭なバンドが検出できた。健常人及びWS患者において、WS-3 mRNAは、サイズ・発現量とも有意差は認められなかった。定量は次のようにおこなった。まず、健常人及びWS患者の各バンドの領域と任意のバックグラウンド領域を指定し、各バンドの放射線強度の定量値からバックグラウンドを減算したもので比較をおこなった（表11）。

【0138】(ii) サンプル間の標準化
前述の方法に従いWS-3プローブをフィルターから除去した。次に、 β アクトニンプローブを用いて同様のハイブリダイゼーションと定量をおこない、各サンプルのシグナ

* ル強度を測定した。すべてのサンプルは線維芽細胞由来で β アクトニンの発現量は同じであるという仮定に基づき、WS-3 mRNA の発現量と β アクトニンmRNAの発現量との比を算出した（表11）。

【0139】(5) 結果

(i) WS-3 mRNA の組織特異的発現

ヒト各組織・臓器由来の2mg poly(A)+RNAを含むMTN プロットI及びII(CLONTECH社製)に、 ^{32}P 標識した WS-3 cDNA の 3'-UTをプローブとしてハイブリダイズさせた。

【0140】WS-3 mRNAの発現は、各種の臓器で幅広く認められ、図5Aのようなパターンを示した。すなわち、WS-3遺伝子は、心臓、骨格筋及び脾臓に於て強く発現し、脳、胎盤、肺、肝臓、腎臓、脾臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、小腸、大腸において中程度に発現し、末梢リンパ球に於ては、僅かしか発現していないことがわかった。Poly(A)+ RNAの起源（図5Aの各レーン）は、aが心臓、bが脳、cが胎盤、dが肺、eが肝臓、fが骨格筋、gが腎臓、hが脾臓、iが脾臓、jが胸腺、kが前立腺、lが精巣、mが卵巣、nが小腸、oが大腸、pが末梢リンパ球のものである。

【0141】(ii) WS-3 mRNA発現の健常人とWS患者との比較（図5B及び図5C、表11）

図5B及び5Cに示すノーザンプロット解析の結果をFuji BAS 1500システムによって定量化した。WS-3 mRNAの発現を β -アクトニンmRNAで標準化した後、健常人とWS患者を%表示により比較した。本データでは、3名のWS患者、3名の健常人の値を比較している。

【0142】

【表11】

レーンNo.	サンプル名称	WS-3 mRNA (PSL)	β -アクトニンmRNA (PSL)	WS-3/ β アクト 比 $\times 10^{-3}$	平均 (%)	
1	Cs-3F0-250	36.3	3517	10.32	7.48	健常人
2	Y.H.	45.1	8897	5.07	(100%)	
3	H.N.	77.9	11050	7.05		
4	WS6201	39.9	6142	6.50	7.44	WS患者
5	WS11901	40.2	6310	6.37	(99.5%)	
6	WS12301	49.9	5285	9.44		

【0143】表11中のレーン1～6は、図5B中のレーン1～6に対応する。レーン1～3は健常人の値を示し、レーン4～6はWS患者の値を示す。健常人及びWS患者の約1.0kb WS-3 mRNA の発現については、サイズ及び発現量ともに両者において差は認められなかった。図5Cに示したポジティブコントロールである β -アクトニンmRNAの発現は、WS患者（レーン4～6）においても健常人（レーン1～3）と同程度の発現が認められた。

【0144】全RNAの由来は、レーン1がCS-3F0-250細胞

※ 胞由来全RNA、レーン2が健常人（Y.H.）細胞由来全RNA、レーン3が健常人（H.N.）細胞由来全RNA、レーン4が患者（WS6201）細胞由来全RNA、レーン5が患者（WS11901）細胞由来全RNA、レーン6が患者（WS12301）細胞由来全RNAである。また、28S及び18S はリボソームRNAサブユニットのサイズの位置を示す。

【0145】以上より、WS-3遺伝子は、種を越えて比較的良く保存され（図4B）、かつ、ヒトのさまざまな組織において高い発現が認められたことから（図5A）、

生体の基本的な恒常性の維持に関わる未知の構成成分をコードしている遺伝子の一つであることが強く示唆され、この遺伝子の発現制御の解明は、生体の恒常性維持を司るメカニズムを解明するうえで有用であり、また、生命の基本的な恒常性を維持するための新規医薬品の創製にも有用であると共に、ウェルナー症候群病発症との関連を解明するための研究にも有用である。

【0146】また、本発明の遺伝子（WS-3遺伝子）は、ウェルナー症候群病発症との関連性のある病気の検査・予防のための診断プローブとして有用である。また、ヒト10個体の発生に関する医科学的、あるいはまた、細胞生物学的、免疫学的、生化学的及び分子生物学的研究のための試薬として、WS-3遺伝子及びそれがコードするタン

* パク質、さらにそのタンパク質に対する抗体は有用である。加えて、WS-3遺伝子はトランスジェニック・ノックアウトマウスを作成し、モデル動物をつくる際に極めて有用であることは明白である。

【0147】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：977

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列：

```

ATT CGG CAC AGC ATG GCG GAG AAG ACT CAA AAG AGT GTG AAG ATT GCT CCT GGA GCA GTT 60
      Met Ala Glu Lys Thr Gln Lys Ser Val Lys Ile Ala Pro Gly Ala Val

GTA TGT GTA GAA AGT GAA ATC AGA GGA GAT GTA ACT ATC GGA CCT CGG ACA GTG ATC CAC 120
Val Cys Val Glu Ser Glu Ile Arg Gly Asp Val Thr Ile Gly Pro Arg Thr Val Ile His

CCT AAA GCA AGA ATT ATT GCG GAA GCC GGG CCA ATA GTG ATT GGC GAA GGG AAC CTA ATA 180
Pro Lys Ala Arg Ile Ile Ala Glu Ala Gly Pro Ile Val Ile Gly Glu Gly Asn Leu Ile

GAA GAA CAG GCC CTT ATC ATA AAT GCT TAC CCA GAT AAT ATC ACT CCT GAC ACT GAA GAT 240
Glu Glu Gln Ala Leu Ile Ile Asn Ala Tyr Pro Asp Asn Ile Thr Pro Asp Thr Glu Asp

CCA GAA CCA AAA CCT ATG ATC ATT GGC ACC AAT AAT GTG TTT GAA GTT GGC TGT TAT TCC 300
Pro Glu Pro Lys Pro Met Ile Ile Gly Thr Asn Asn Val Phe Glu Val Gly Cys Tyr Ser

CAA GCC ATG AAG ATG GGA GAT AAT AAT GTC ATT GAA TCA AAA GCA TAT GTA GGC AGA AAT 360
Gln Ala Met Lys Met Gly Asp Asn Asn Val Ile Glu Ser Lys Ala Tyr Val Gly Arg Asn

GTA ATA TTG ACA AGT GGC TGC ATC ATT GGG GCT TGT TGC AAC CTA AAT ACA TTT GAA GTC 420
Val Ile Leu Thr Ser Gly Cys Ile Ile Gly Ala Cys Cys Asn Leu Asn Thr Phe Glu Val

ATC CCT GAG AAT ACG GTG ATC TAT GGT GCA GAC TGC CTT CGT CGG GTG CAG ACT GAG CGA 480
Ile Pro Glu Asn Thr Val Ile Tyr Gly Ala Asp Cys Leu Arg Arg Val Gln Thr Glu Arg

CCG CAG CCC CAG ACA CTA CAG CTG GAT TTC TTG ATG AAA ATC TTG CCA AAT TAC CAC CAC 540
Pro Gln Pro Gln Thr Leu Gln Leu Asp Phe Leu Met Lys Ile Leu Pro Asn Tyr His His

CTA AAG AAG ACT ATG AAA GGA AGC TCA ACT CCA GTA AAG AAC TAA GAA CAG TGT ATA ACA 600
Leu Lys Lys Thr Met Lys Gly Ser Ser Thr Pro Val Lys Asn

TGA AGA TAA CAT TTT GTC TTT GAC CAC TGT CTT TTG AAT GGG CCC ACA GTG TTT ATG TAC 660

TCT TAA CAA CTC ACA GAA TAA TAC ATG TTC ACT TTA TTT TGT AAA ATT GGG TTG AGA GGA 720

AAC TAA TGG AGT TTC ATT GTA ACT GTC CTT TGT AAT TTA TAT AAA TGT ATT ATT TTC CTA 780

TAT CCT TGG TTC TTT TCT GAT AAT TTA CAG ATT TAG CTT TTC TTT TGT TAT ATA AAC TGC 840

TAG CCA CAA AAT TTA GTT ATG TAA AAG GCT ACC CTT GAC AAG AAA AGA CAT ACT CTC ATG 900

TAT TTA TAT TAT AGC ATA GAC TAA ACT GAA TAA AAA TGC TGA TAA CTA AAA AAA AAA AAA 960

AAA AAA AAA AAA AAA AA 977

```

【0148】配列番号：2

配列の長さ：190

※配列の型：アミノ酸

※50 トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

* * 配列：

MAEKTQKSVK IAPGAVVCVE SEIRGDTVIG PRTVIHPKAR IIAEAGPIVI 50
 GEGNLEEQA LIINAYPDNI TPDTEDEPK PMIIGTNNVF EVGCYSQAMK 100
 MGDNNVIESK AYVGRNVILT SGCIIGACCN LNTFEVIPEN TVIYGADCLR 150
 RVQTERPQPQ TLQLDFLMKI LPNYHHLKKT MKGSSTPVKN 190

【0149】配列番号：3

※トポロジー：直鎖状

配列の長さ：977

配列の種類：cDNA to mRNA

配列の型：核酸

配列：

鎖の数：二本鎖

※10

ATT CGG CAC AGC ATG GCG GAG AAG ACT CAA AAG AGT GTG AAG ATT GCT CCT GGA GCA GTT 60
 TAA GCC GTG TCG TAC CGC CTC TTC TGA GTT TTC TCA CAC TTC TAA CGA GGA CCT CCT CAA
 GTA TGT GTA GAA AGT GAA ATC AGA GGA GAT GTA ACT ATC GGA CCT CGG ACA GTG ATC CAC 120
 CAT ACA CAT CTT TCA CTT TAG TCT CCT CTA CAT TGA TAG CCT GGA GCC TGT CAC TAG GTG
 CCT AAA GCA AGA ATT ATT GCG GAA CCC GCG CCA ATA GTG ATT GCG GAA GCG AAC CTA ATA 180
 GGA TTT CGT TCT TAA TAA CGC CTT CGG CCC GGT TAT CAC TAA CCG CTT CCC TTG GAT TAT
 GAA GAA CAG GCC CTT ATC ATA AAT GCT TAC CCA GAT AAT ATC ACT CCT GAC ACT GAA GAT 240
 CTT CTT CTC CGG GAA TAG TAT TTA CGA ATG GGT CTA TTA TAG TGA GGA CTG TGA CTT CTA
 CCA GAA CCA AAA CCT ATG ATC ATT GCG ACC AAT AAT GTG TTT GAA GTT GCG TGT TAT TCC 300
 GGT CTT GGT TTT GGA TAC TAG TAA CCG TGG TTA TTA CAC AAA CTT CAA CCG ACA ATA AGG
 CAA GCC ATG AAG ATG GGA GAT AAT AAT GTC ATT GAA TCA AAA GCA TAT GTA GGC AGA AAT 360
 GTT CGG TAC TTC TAC CCT CTA TTA TTA CAG TAA CTT AGT TTT CGT ATA CAT CCG TCT TTA
 GTA ATA TTG ACA AGT GGC TGC ATC ATT GGG GCT TGT TGC AAC CTA AAT ACA TTT GAA GTC 420
 CAT TAT AAC TGT TCA CCG ACG TAG TAA CCC CGA ACA ACG TTG GAT TTA TGT AAA CTT CAG
 ATC CCT GAG AAT ACG GTG ATC TAT GGT GCA GAC TGC CTT CGT CGG GTG CAG ACT GAG CGA 480
 TAG GGA CTC TTA TGC CAC TAG ATA CCA CGT CTG ACG GAA GCA GCG CAC GTC TGA CTC GCT
 CCG CAG CCC CAG ACA CTA CAG CTG GAT TTC TTG ATG AAA ATC TTG CCA AAT TAC CAC CAC 540
 GGC GTC GGG GTC TGT GAT GTC GAC CTA AAG AAC TAC TTT TAG AAC GGT TTA ATG GTG GTG
 CTA AAG AAG ACT ATG AAA GGA AGC TCA ACT CCA GTA AAG AAC TAA GAA CAG TGT ATA ACA 600
 GAT TTC TTC TGA TAC TTT CCT TCG AGT TGA GGT CAT TTC TTG ATT CTT GTC ACA TAT TGT
 TGA AGA TAA CAT TTT GTC TTT GAC CAC TGT CTT TTG AAT GGG CCC ACA GTG TTT ATG TAC 660
 ACT TCT ATT CTA AAA CAG AAA CTG GTG ACA GAA AAC TTA CCC GGG TGT CAC AAA TAC ATG
 TCT TAA CAA CTC ACA GAA TAA TAC ATG TTC ACT TTA TTT TGT AAA ATT GGG TTG AGA GGA 720
 AGA ATT GTT GAG TGT CTT ATT ATG TAC AAG TGA AAT AAA ACA TTT TAA CCC AAC TCT CCT
 AAC TAA TGG AGT TTC ATT GTA ACT GTC CTT TGT AAT TTA TAT AAA TGT ATT ATT TTC CTA 780
 TTG ATT ACC TCA AAG TAA CAT TGA CAG GAA ACA TTA AAT ATA TTT ACA TAA TAA AAG GAT
 TAT CCT TGG TTC TTT TCT GAT AAT TTA CAG ATT TAG CTT TTC TTT TGT TAT ATA AAC TGC 840
 ATA GGA ACC AAG AAA AGA CTA TTA AAT GTC TAA ATC GAA AAG AAA ACA ATA TAT TTG ACG
 TAG CCA CAA ATT TTA GTT ATG TAA AAG GCT ACC CTT GAC AAG AAA AGA CAT ACT GTC ATG 900
 ATC GGT GTT TAA AAT CAA TAC ATT TTC CGA TGG GAA CTG TTC TTT TCT GTA TGA CAC TAC
 TAT TTA TAT TAT AGC ATA GAC TAA ACT GAA TAA AAA TGC TGA TAA CTA AAA AAA AAA AAA 960
 ATA AAT ATA AAA TCG TAT CTG ATT TGA CTT ATT TTT ACG ACT ATT GAT TTT TTT TTT TTT
 AAA AAA AAA AAA AAA AA 977
 TTT TTT TTT TTT TTT TT

【0150】配列番号：4

★配列の型：核酸

配列の長さ：19

★50 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸（合成DNA）
 配列：
 GAT TTA GGT GAC ACT ATA G
 【0151】配列番号：5
 配列の長さ：20
 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸（合成DNA）
 配列：
 TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
 【0152】配列番号：6
 配列の長さ：21
 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸（合成DNA）
 配列：
 ATC TCA GTG GTA TTT GTG AGC
 【0153】配列番号：7
 配列の長さ：24
 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸（合成DNA）
 配列：
 GTG AAC TGC ACT GTG ACA AGC TGC
 【0154】配列番号：8
 配列の長さ：22
 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸（合成DNA）
 配列：
 CAC CTG AGG AGT GAA TTG GTC G
 【0155】配列番号：9
 配列の長さ：16
 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸（合成DNA）
 配列：
 TGW GNA GWA NCA SAG A
 【0156】配列番号：10
 配列の長さ：16
 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：
 AGW GNA GWA NCA WAG G
 【0157】配列番号：11
 配列の長さ：16
 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸（合成DNA）
 配列の特徴：
 10 特徴を表す記号：modified base
 存在位置：6
 特徴を決定した方法：E
 他の情報：Inosine
 特徴を表す記号：modified base
 存在位置：11
 特徴を決定した方法：E
 他の情報：Inosine
 配列：
 CAW CGI CNG AIA SGA A
 20 【0158】配列番号：12
 配列の長さ：16
 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸（合成DNA）
 配列の特徴：
 特徴を表す記号：modified base
 存在位置：5
 特徴を決定した方法：E
 30 他の情報：Inosine
 特徴を表す記号：modified base
 存在位置：11
 特徴を決定した方法：E
 他の情報：Inosine
 配列：
 TCS TIC GNA CIT WGG A
 【0159】配列番号：13
 配列の長さ：23
 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸（合成DNA）
 配列：
 TTG ACA AGT GGT TGC ATC ATT GG
 【0160】配列番号：14
 配列の長さ：22
 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状
 50 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列:

TGA AGT CAT CCC TGA GAA TAC G

【0161】配列番号: 15

配列の長さ: 22

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

配列:

CCT TCG TCG GGT GCA GAC TGA G

【0162】配列番号: 16

配列の長さ: 24

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

配列:

CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC

【0163】配列番号: 17

配列の長さ: 22

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

配列:

TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA C

【0164】配列番号: 18

配列の長さ: 26

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

配列:

TAT CGG ACC TCG GAC AGT GAT CCA CC

【0165】配列番号: 19

配列の長さ: 28

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

配列:

GGG CCA ATA GTG ATT GGC GAA GGG AAC C

【0166】配列番号: 20

配列の長さ: 28

配列の型: 核酸

配列:

TTC TAG AAT TCA GCG GCC GCT TTT TTT

TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT

TTV N

【0172】配列番号: 26

* 鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

配列:

TGG CAC CAA TAA TGT GTT TGA AGT TGG C

【0167】配列番号: 21

配列の長さ: 24

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

10 トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

配列:

CCC CAA TGA TGC AGC CAC TTG TCA

【0168】配列番号: 22

配列の長さ: 28

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

20 配列:

CCC ATC TTC ATG GCT TGG GAA TAA CAG C

【0169】配列番号: 23

配列の長さ: 27

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

配列:

CCA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC

30 【0170】配列番号: 24

配列の長さ: 23

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

配列:

ACT CAC TAT AGG GCT CGA G

CG GC

【0171】配列番号: 25

40 配列の長さ: 52

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

*

※50※配列の長さ: 24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

CGA CGA GGC CCA GAG CAA GAG AGG

【0173】配列番号：27

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

CCA CAT CTG CTG GAA GGT G *

* GA CAG

【図面の簡単な説明】

【図1】WS遺伝子領域のP1/PACクローンの遺伝子物理地図とWS-3遺伝子及び既知遺伝子の位置を示す図である。

【図2】WS-3遺伝子がコードするタンパク質を示す模式図である。

【図3】WS-3遺伝子を含むPAC クローンをを用いたFISHによる解析結果を示す写真である（生物の形態）。

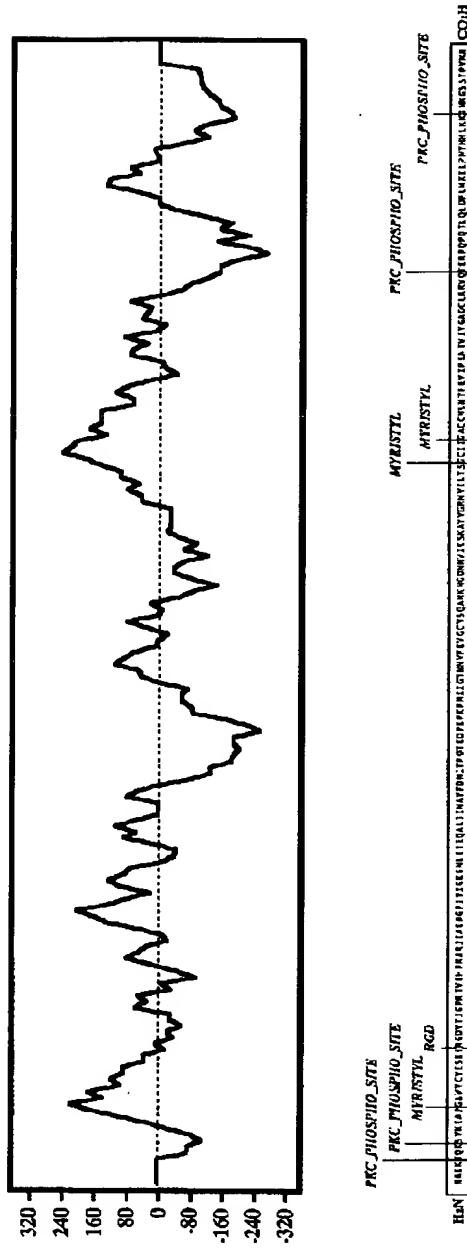
10 【図4】WS-3遺伝子のサザンプロットによる解析結果を示す電気泳動の写真である。

【図5】WS-3遺伝子のノーザンプロットによる解析結果を示す電気泳動の写真である。

【図3】



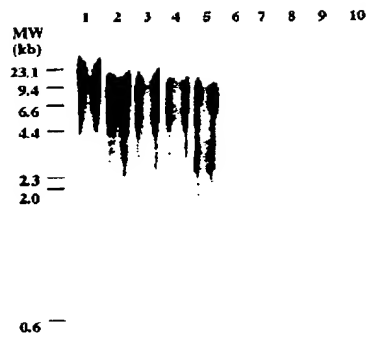
Kyte-Doolittle Hydrophobicity



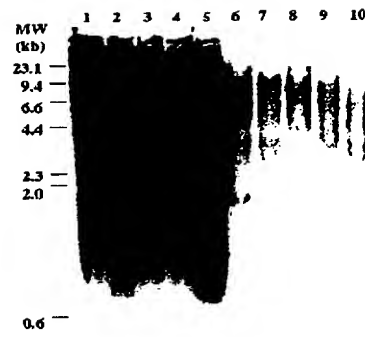
Tentative protein motifs	Consensus	Amino acid residue No.
Cell attachment sequence	R-G-D	#24
Protein kinase C phosphorylation site	[ST]-X-[RK]	#5, #8, #153, #180
N-myristoylation site	G-[EDKRHPVFW]-XX-[STAGCN]-[P]	#14, #122, #126

【図 4】

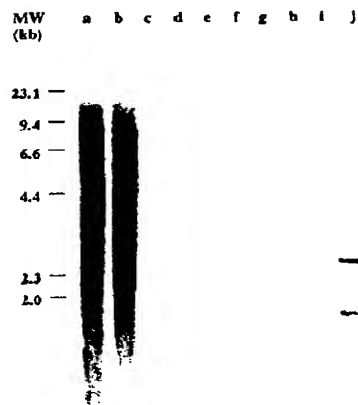
(A)



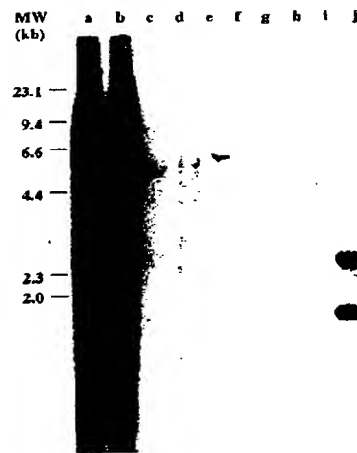
(B)



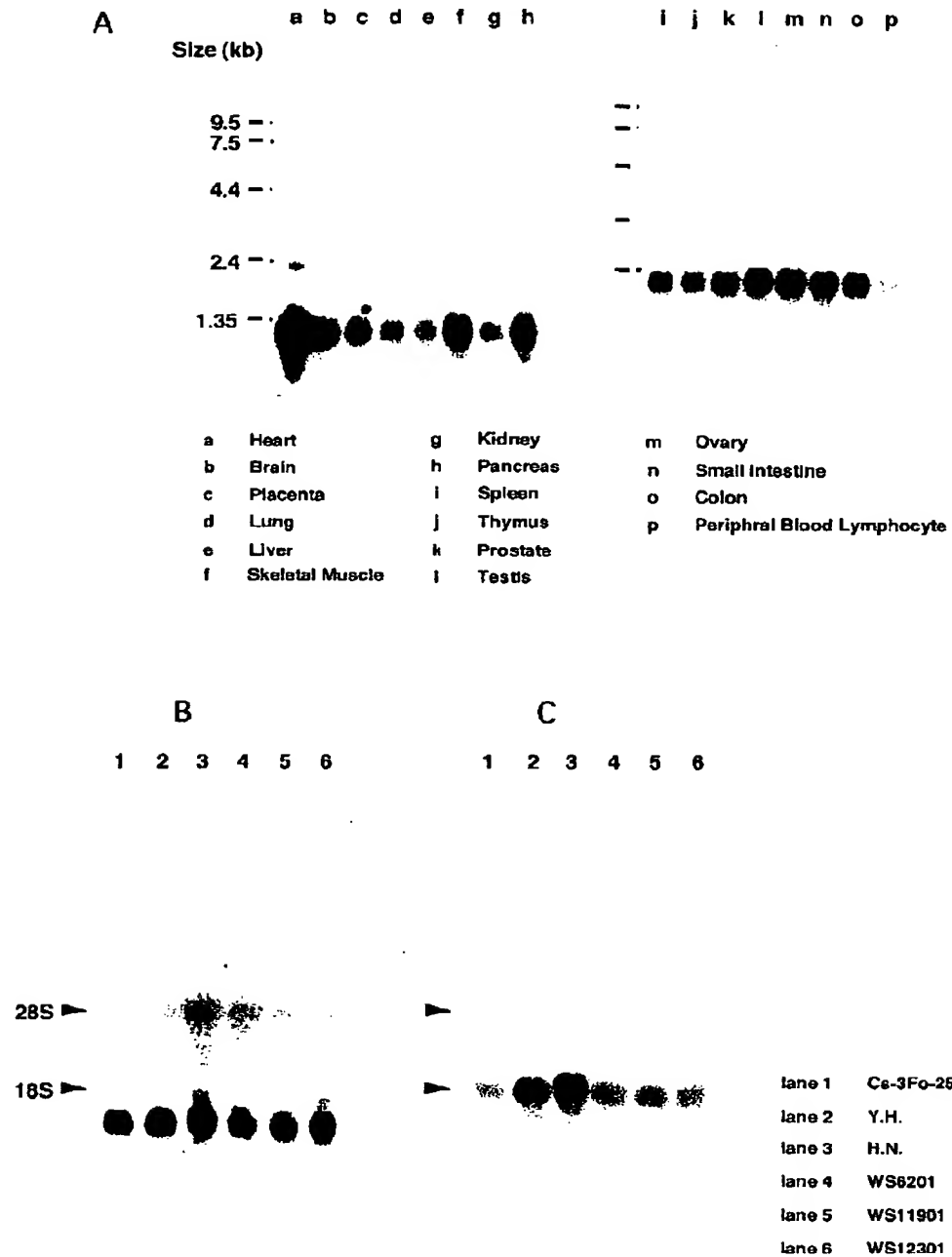
(C)



(D)



【図 5】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 1/19			C 1 2 N 1/19	
1/21			1/21	
5/10			C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02			21/08	
21/08		7823-4B	C 1 2 Q 1/68	A

(28)

特開平9-238683

C12Q 1/68

C12N 5/00

B

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **09238683 A**

(43) Date of publication of application: **16.09.97**

(51) Int. Cl

C12N 15/02
A01K 67/027
C07H 21/04
C07K 14/47
C07K 16/18
C12N 1/19
C12N 1/21
C12N 5/10
C12P 21/02
C12P 21/08
C12Q 1/68

(21) Application number: **08055144**

(22) Date of filing: **12.03.96**

(71) Applicant: **EIJIIN KENKYUSHO:KK**

(72) Inventor: **FURUICHI YASUHIRO**
GOTO MAKOTO

(54) **NEW WS-3 GENE IN REGION IN WHICH
CASUAL GENE OF WERNER'S SYNDROME IS
PRESENT AND PROTEIN FOR WHICH THE
GENE CODES**

COPYRIGHT: (C)1997,JPO

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new WS-3 gene for a medicine or its raw material, etc., useful for curing, diagnosing, etc., Werner's syndrome, lying in a region of casual genes of Werner's syndrome and coding for a new polypeptide having a specific amino acid sequence.

SOLUTION: This new WS-3 gene codes for a new polypeptied essentially containing an amino acid sequence expressed by the formula, lies in a region of casual genes of Werner's syndrome and is useful for curing and diagnosing Werner's syndrome and producing a polypeptide, transgenic knockout mice, etc., which are effective for curing and diagnosing the Werner's syndrome. The gene is obtained by a usual method by extracting mRNA from WS fibroblast established from skin tissue sections obtained from clinically recognized Werner's syndrome patients, preparing a fuzzy library of cDNA using the same, screening with a DNA probe marked with the same and recovering the gene from an obtained positive clone.

MAEKTQKSVK IAPGAVVCVE SEIRGQVITG PRVYDHPKAR IIAEAGPIVZ 99
GEGNLEEEQA LIINAYPDNI TPDTEDPEPK PHIEGTNNVF EVGCYSQANK 100
MGDNVYDESK AYVBRNVILT SGCIIGACDH LNTFEVIXER TVIYGAGCLR 100
RVQTERPQPK TLQLDFLAKI LPNVNHLIOCT HKGSSTPVKM 100